



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES**

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE
RIESGO ECOLÓGICO PARA FAUNA TERRESTRE**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

M.C. GUILLERMO ESPINOSA REYES

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA**

**COMITÉ TUTELAR:
DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE
DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

JUNIO DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES**

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN
DE RIESGO ECOLÓGICO PARA FAUNA TERRESTRE**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

M.C. GUILLERMO ESPINOSA REYES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

SINODALES:

PRESIDENTE:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA _____

SECRETARIO:

DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE _____

VOCAL:

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ _____

VOCAL:

DR. JUAN ANTONIO REYES AGÜERO _____

VOCAL:

DR. LEONARDO CHAPA VARGAS _____

PROYECTO REALIZADO EN:

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

CON FINANCIAMIENTO DE:

**INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA (INE)
(CONVENIO No: A1- 047/2007)**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) Y
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES (SEMARNAT)
(CONVENIO No: SEMARNAT-2002-C01-0362)**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
(CONVENIO No: C07-FAI-11-2.38)**

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO A TRAVÉS DEL PROGRAMA
NACIONAL DE POSGRADOS (PNP - CONACYT).**

Productos generados durante la realización de esta investigación:

Artículos:

- Jasso-Pineda, Y.; **Espinosa-Reyes, G.**; González-Mille, D.; Razo-Soto, I.; Carrizales, L.; Torres-Dosal, A.; Mejía-Saavedra, J.; Monroy M.; Ize, A.I.; Yarto, M. y Díaz-Barriga, F. 2007. An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3): 344-350
- Espinosa-Reyes, G.**; Torres-Dosal, A. Ilizaliturri, C.; González-Mille, D.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. Wild rodents (*Dipodomys merriami*) like biomonitors in the mining sites. *Journal of Environmental Science and Health A*. [En revisión]
- Espinosa-Reyes, G.**; Ilizaliturri, C.; González-Mille, D.; Costilla, R.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. DNA Damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as indicator of environmental Stress in the industrial zone Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health A*. [En revisión]
- Ilizaliturri, C.; González-Mille, D.; Pelallo, N; Domínguez, G.; Pérez-Maldonado, I.; Mejía-Saavedra, J.; Batres, L.; Díaz-Barriga, F.; **Espinosa-Reyes, G.** Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interciencia*. [En revisión]

Informes técnicos:

- Espinosa-Reyes, G.**, Ilizaliturri, C.A., González-Mille, D.J., Pelallo, N.A., Costilla-Salazar, R., Trejo, A., Pérez-Maldonado, I.N. Mejía Saavedra, J. y Díaz-Barriga, F. 2007. “Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios contaminados de México - caso de estudio Coatzacoalcos, Veracruz”. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 101 p.
- UASLP. 2007. “Guía de monitoreo y biomonitorio, y del programa de monitoreo”, la cual forma parte del proyecto “Monitoreo ambiental, determinantes de la exposición y efectos de contaminantes críticos en humanos y biota en Coatzacoalcos, Veracruz” (Número de convenio: A1-047). Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 59 p.

- Carrizales, L.; Jasso, Y.; **Espinosa-Reyes, G.**; Torres-Dosal, A.; Díaz-Barriga, F. 2006. *Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México - caso de estudio Villa de la Paz, S.L.P.* Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 64 p. DISPONIBLE EN: http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005_inf_final_met_estudio_caso.pdf
- Torres, A.; **Espinosa-Reyes, G.**; Ilizaliturri, I.; González, D.; Razo, I.; Mejía, J.; Díaz-Barriga, F. 2005. *Desarrollo de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México.* Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 130 p. DISPONIBLE EN: http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005_inf_final_met_integrada.pdf

Capítulos de libro:

- Díaz-Barriga, F.; Torres, A.; Mejía, J. **Espinosa-Reyes, G.**; Ilizaliturri, C.; González, D. 2006. *Anexo 1: Método para la elaboración de estudios de evaluación e riesgo ambiental.* 67-108 pp. En: Ruíz, U. 2006. Guía técnica para orientar la elaboración de estudios de evaluación de riesgo ambiental de sitios contaminados. SEMARNAT-DGGIMAR. México, Distrito Federal. 314 p.
- Díaz-Barriga, F.; Torres, A.; Mejía, J. **Espinosa-Reyes, G.**; Ilizaliturri, C.; González, D. 2006. *Anexo 2: Método para la elaboración de estudios de evaluación e riesgo ambiental cuando los receptores son seres humanos.* 109-134 pp. En: Ruíz, U. 2006. Guía técnica para orientar la elaboración de estudios de evaluación de riesgo ambiental de sitios contaminados. SEMARNAT-DGGIMAR. México, Distrito Federal. 314 p.

DEDICATORIA

A mis padres por su amor, amistad, confianza y comprensión. Su apoyo ha sido crucial en muchas etapas de mi vida. Agradezco infinitamente su respaldo en todas las decisiones que he tomado y por que se que siempre puedo contar con ellos. A Ustedes les debo mucho, los amo.

A mi hermano y su hermosa familia. Por su amistad incondicional, cariño, comprensión y por que estoy seguro de que siempre puedo contar con ellos.

A Gaby por su amor, amistad, confianza, comprensión y apoyo incondicional. Por estar a mi lado y ser mi cómplice.

A la “Band of Brothers” (Xela, Aaron, Dan, Fer, Lau, Marilú, Jany, Isra, Chucho), ya que a pesar de andar regados en diversas lugares nuestra amistad y confianza no aminora, porque es verdadera.

A mis compañeros y amigos Cesar, Dona, Diana, Roy, Toño, Norma, Edna, Nadia, Rebeca, Arturo, Marilú, Jorge, Pedro, Iván, Fernando, Jesús, por los buenos y malos momentos que hemos vivido.

En memoria de Raquel Tovar Gutiérrez (†).

AGRADECIMIENTOS

Instituciones:

Al Instituto Nacional de Ecología, que solventó la mayor parte de los gastos asociados a la presente investigación.

Al Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales por la formación académica recibida en sus aulas, vinculada a mi formación profesional.

Al Departamento de Toxicología Ambiental de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

A la Universidad Veracruzana campus Coatzacoalcos y al CETMAR 15.

Personas:

A mi director de tesis Dr. José de Jesús Mejía Saavedra por su apoyo y ayuda en el planteamiento y ejecución de este trabajo. Por haberme brindado amablemente su experiencia y conocimientos.

A mis asesores Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre y Dr. Fernando Díaz-Barriga Martínez, por su participación y disposición a dedicar su tiempo para atender los asuntos relacionados con mi trabajo de tesis. Por sus comentarios y correcciones siempre atinados para poder llevar a buen termino este trabajo.

A los Drs. Juan Antonio Reyes Agüero y Leonardo Chapa Vargas por aceptar amablemente participar como sinodales. Sus cuestionamientos y sugerencias fueron muy valiosos para mejorar este trabajo.

A las Dras. Leticia Yáñez Estrada y Yolanda Jasso Pineda por su valioso apoyo en la realización del ensayo cometa.

A la Q.F.B. Lili Batres, I.Q. Izanami López, Dr. Antonio Trejo, M. en C. Rogelio Costilla, Q.F.B Norma Rivero y a la Dra. Dania López por su apoyo en la determinación de COPs en muestras ambientales y biológicas.

A mis compañeros de TOXI: Carriz, Yáñez, los “tres” Jorges, Chio, Batres, Tere, Maribel, Octavio, Yei, Lidia, por brindarme su amistad y apoyo.

A la M.C. María del Carmen Cuevas Díaz y a la Ing. Margarita Demartini, por su apoyo en la realización de este trabajo en Coatzacoalcos, Veracruz.

Seguramente los recuerdos me deben estar haciendo cometer omisiones involuntarias de algunos nombres, pero aún así gracias a todos los que de manera directa o indirecta me apoyaron para concluir este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN.- Ácido Desoxirribonucleico

Ag.- Plata

Au.- Oro

CEQG.- Guías Canadienses de Calidad Ambiental

CG-M.- Cromatografía de Gases Masas

H.- Constante de Henry

COPs.- Contaminantes Orgánicos Persistentes

COVs.- Compuestos Orgánicos Volátiles

Cu.- Cobre

DDT.- Diclorodifeniltricloroetano

E.E.- Error Estándar

EAA.- Espectrofotometría de Absorción Atómica

EMEGs.- Guías de Medios Ambientales

FAO.- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación

µg.- Microgramos

µL.- Microlitros

g.- Gramos

HAPs.- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HCB.- Hexaclorobenceno

HCH.- Hexaclorociclohexano

Koc.- Coeficiente de adsorción al suelo

Kow.- Coeficiente de partición *n*-octanol-agua

MDM.- Matorral Desértico Micrófilo

NOAA.- Administración Nacional Oceánica y Atmosférica

OPS.- Organización Panamericana de la Salud

Pb.- Plomo

PCBs.- Compuestos Bifenilos Policlorados

SEMARNAT.- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales

Sn.- Estaño

S.- Solubilidad en agua

TRVs.- Valores Tóxicos de Referencia

Zn.- Zinc

ÍNDICE DE CONTENIDO	PÁGINA
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
RESUMEN.....	2
Objetivo general.....	7
Objetivos particulares.....	7
PROBLEMÁTICA GENERAL DE LOS SITIOS DE ESTUDIO	8
Villa de la Paz, San Luis Potosí.....	9
Coatzacoalcos, Veracruz.....	10
Daño al ADN.....	12
Importancia biológica de las especies animales seleccionadas.....	12
REFERENCIAS	16
 PRIMER ARTÍCULO .- Revisión de las Metodologías sobre Evaluación de Riesgos en Salud para el Estudio de Comunidades Vulnerables en América Latina.....	 23
 SEGUNDO ARTÍCULO .- An Integrated Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead.....	 49
 TERCER ARTÍCULO .- Wild Rodents (<i>Dipodomys merriami</i>) like Biomonitor in Contaminated Mining Sites.....	 74
 CUARTO ARTÍCULO .- Effects in the wild rodents community of a mining site in San Luis Potosí, Mexico.....	 101
 QUINTO ARTÍCULO .- DNA damage in earthworms (<i>Eisenia</i> spp.) as indicator of environmental stress in the industrial zone Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico.....	 120
 DISCUSIÓN GENERAL	 147
 CONCLUSIONES GENERALES	 160
Villa de la Paz, San Luis Potosí.....	161
Coatzacoalcos, Veracruz.....	162
 GLOSARIO	 165
 ANEXO I .- SELECCIÓN DE GRUPOS ANIMALES.....	 172
 ANEXO II .- METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS DE METALES Y COPs EN MATRICES BIOLÓGICAS.....	 177
 ANEXO III .- RESULTADOS DE COPs EN IGUANAS CAPTURADAS EN COATZACOALCOS.....	 181



INTRODUCCIÓN GENERAL



RESUMEN

En la evaluación integrada de riesgo se evalúa de manera simultánea diferentes componentes del ecosistema. Ésta metodología esta basada en biomarcadores de exposición y de efecto y se enfoca a los escenarios reales que se presentan en un sitio contaminado, tales como: presencia de mezclas de contaminantes, diferentes componentes ambientales, varias rutas de exposición y principalmente, el impacto simultáneo sobre los diversos receptores (humanos y otros). El objetivo del presente trabajo fue establecer e implementar una metodología para evaluar riesgo ecológico en fauna terrestre para sitios contaminados, bajo el contexto del diseño e implementación de la metodología integrada de riesgos. Aplicando ésta metodología en el sitio minero de Villa de la Paz se registraron altas concentraciones de metales y fragmentación del ADN en niños y roedores silvestres. Los resultados obtenidos sirvieron para recabar evidencias de peso del riesgo a la salud de población infantil y roedores por exposición a metales. Por otro lado, utilizando modelos de simulación probabilística (Monte Carlo) fue posible establecer las dosis de exposición a arsénico en niños y *Dipodomys merriami* a través de la ingesta accidental de suelo y se observó un patrón similar de fragmentación del ADN en ambos receptores. Con base en lo anterior se postuló a *D. merriami* como biomonitor en sitios mineros con características similares a Villa de la Paz. También, se evaluaron las comunidades de roedores silvestres durante cinco salidas de campo de Septiembre de 2005 a Marzo de 2007. Se capturaron en total 77 roedores, 43 en el sitio de referencia y 34 en el sitio contaminado. En ambos sitios *Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni* fueron las especies más abundantes. Se registró mayor diversidad en la comunidad de roedores del sitio de referencia. Esto representa una evidencia más, del riesgo que existe en Villa de la Paz, San Luis Potosí. Se implementó esta metodología en Coatzacoalcos, Veracruz, éste es un sitio industrial con características bióticas y abióticas completamente diferentes a Villa de la Paz. El Río Coatzacoalcos es considerado por diferentes autores como uno de los más contaminados de México, ya que se han registrado diferentes grupos de contaminantes (COPs, HAPs, COVs, HTPs, Metales). En este trabajo se evaluaron receptores del sistema terrestre (lombrices de tierra e iguanas). Se utilizaron biomarcadores de exposición a Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) y el ensayo cometa como biomarcador de efecto. Las concentraciones de COPs en suelo superan los niveles de seguridad establecidos por las normas internacionales. En lombrices capturadas en Coatzacoalcos se registró mayor



fragmentación del ADN con respecto a lombrices adquiridas comercialmente. En iguanas se demostró exposición a COPs en diferentes tejidos (músculo, hígado y adiposo), la ingesta de carne de iguana podría representar una importante ruta de exposición a COPs en la población rural de la región. Los resultados obtenidos son evidencias del impacto ambiental en el que se encuentra la fauna silvestre en la región de Coatzacoalcos, Veracruz.



La evaluación del riesgo es un proceso que tiene como objetivo asignar valores, magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de la contaminación sobre los seres vivos. En consecuencia, este proceso se puede utilizar para definir si un sitio contaminado merece o no ser intervenido (Díaz-Barriga, 1999). Con ello se puede establecer el grado de contaminación presente en un sitio genera efectos nocivos; entre mayor sea el riesgo de que la contaminación afecte a los seres vivos, mayor será la necesidad de instrumentar programas de restauración. Por razones prácticas, las metodologías de evaluación de riesgo para salud humana y para biota (riesgo ecológico) se han desarrollado de manera independiente; sin embargo, paulatinamente se ha reconocido cada vez más la exigencia de establecer mejores niveles de protección tanto al ser humano como a los otros componentes del ambiente; por ello, surgió la necesidad de diseñar una metodología de evaluación integrada de riesgo que incluya tanto a la población humana, como a los otros componentes del ecosistema en un sólo proceso (Torres *et al.*, 2005; Ilizaliturri *et al.*, en revisión). En muchos casos, la contaminación ambiental afecta más a los organismos no humanos (debido a una mayor exposición) e incluso éstos resultan ser los más sensibles a los efectos negativos (Suter, 1993; Aylward *et al.*, 1996; Espinosa-Reyes *et al.*, en revisión a;b). Por lo anterior, se generó una metodología de evaluación integrada de riesgo, en la cual se evalúa de manera simultánea a diferentes componentes del ecosistema. Ésta metodología se enfoca a los escenarios reales que se presentan en un sitio contaminado, tales como: la presencia de mezclas de contaminantes, diferentes compartimientos o componentes ambientales, varias rutas de exposición y principalmente, el impacto simultáneo sobre los diversos receptores (humanos y otros).

Ésta metodología está diseñada para poder ser implementada en cualquier sitio contaminado. De acuerdo con Suter *et al.*, (2003) existen diferentes tipos de integración: a) exposición, b) efectos, c) múltiples sustancias químicas y agentes peligrosos, d) Múltiples rutas de exposición, e) Múltiples escalas espaciales y temporales, f) Ciclo de vida de los productos. En el presente trabajo de investigación la integración de la información se realizó con base en el análisis de biomarcadores de exposición y de efecto, principalmente en Villa de la Paz, San Luis Potosí.



Extrapolación de efectos en diferentes niveles de organización biológica

Collier (2003) menciona que uno de los principales objetivos de los toxicólogos ambientales es establecer vínculos de causalidad entre la exposición a una sustancia o sustancias tóxicas, y los consiguientes efectos biológicos. El mismo autor menciona que en el laboratorio, donde los investigadores estudian las relaciones entre la exposición a un número limitado de sustancias tóxicas y alteraciones en un número limitado de variables, tales vínculos pueden ser examinados exhaustiva y minuciosamente. Las réplicas de laboratorio y los estudios de las diferentes dosis-respuesta definitivamente permiten al investigador establecer vínculos de causalidad entre exposición y efecto. Sin embargo, cuando esos vínculos se quieren registrar en los ecosistemas naturales, existen muchos otros factores capaces de interferir con nuestra capacidad para poder establecer afirmaciones definitivas respecto a la causalidad entre exposición y efectos. Entre estos factores confundentes se incluyen: la presencia de mezcla de contaminantes en distintas matrices ambientales, estresores ambientales (naturales y antropógenos) que no tienen relación con la contaminación (ej. cambio de uso de suelo, competencia, enfermedades, presiones de depredación, disponibilidad de alimento, refugios, etc.) y por supuesto la alta variabilidad biológica intrínseca en todos los componentes de los ecosistemas naturales.

De acuerdo con Odum (1971) un ecosistema incluye a la comunidad de un área, que actúa en reciprocidad con el medio físico, a través de una corriente de energía. Se reconocen diferentes niveles de organización biológica jerárquica (genes – células – órganos – organismos – poblaciones – comunidades – ecosistemas – paisaje). Una de los corolarios de este concepto de niveles de organización es que los efectos que se den a un nivel pueden propagarse a otros niveles. Sin embargo, si se detectan reacciones en niveles de organización inferiores no significa necesariamente que éstas se verán reflejadas en niveles superiores de organización (van den Brink *et al.*, 2008). Actualmente, existen herramientas de simulación mediante las cuales se podría llegar a realizar una extrapolación de efectos a niveles superiores de organización biológica (ej. RAMAS Ecotoxicology of Applied Biomathematics). Sin embargo, a pesar de que se ha progresado en el desarrollo y validación de biomarcadores de exposición y efecto, como base para el entendimiento de las interacciones de contaminantes y organismos (en el sistema acuático, principalmente), aún existe mucha incertidumbre respecto



a la validez y relevancia ecológica de la extrapolación de esas respuestas a diferentes niveles de organización biológica. Hyne y Maher, (2003) mencionan que actualmente el papel que tienen los biomarcadores en la evaluación de riesgo ecológico, es fundamentalmente utilizada para proveer líneas de evidencia que pueden ser usadas para demostrar una probable relación entre las respuestas moleculares, bioquímicas e histológicas y los efectos adversos en poblaciones naturales evaluadas en estudios de campo.

Dentro del contexto del diseño y evaluación de la metodología integrada de riesgos que se propone en el presente trabajo de investigación, se encausó en el riesgo ecológico en fauna terrestre. El riesgo ecológico es la probabilidad de que se presenten efectos adversos en la biota, ocasionados por contaminantes, sobre los diferentes niveles de organización biológica.

Es importante mencionar que los desastres denominados naturales, como huracanes, erupciones volcánicas, tornados, etc. también representan un riesgo ecológico; sin embargo este tipo de fenómenos en su naturaleza no pueden ser controlados por el ser humano, mientras que los disturbios de origen antropógeno si se pueden prevenir, mitigar o solucionar.

En un escenario ecológico, la evaluación de riesgo debe considerar las expresiones actuales y futuras de efectos ecológicos adversos en condiciones de campo. En este contexto, los organismos de vida silvestre pueden ser utilizados como biomonitores; ya que es posible obtener datos sobre exposición y efecto en un ambiente contaminado, los cuales se pueden regular y registrar sistemáticamente para ser analizados con la finalidad de identificar peligros potenciales para el ecosistema y en particular para los seres humanos. La fauna silvestre puede ser utilizada para revelar la presencia de contaminación ambiental. Además, en la biota se puede evaluar la biodisponibilidad del o los contaminantes presentes en un sitio establecido o en un componente ambiental determinado. Los organismos silvestres pueden reflejar la exposición a diferentes rutas, incluyendo la transferencia a través de la cadena alimentaria, sobre todo cuando se encuentran crónicamente expuestos. Así también, los efectos observados pueden ser el reflejo de la exposición a mezclas de contaminantes de un sitio específico. En resumen, los organismos de vida silvestre representan un buen modelo para realizar estudios de exposición y efecto a diferentes contaminantes ambientales o a mezclas de contaminantes, por lo que pueden dar una idea real del riesgo en que se pueden encontrar los organismos en su hábitat natural o en sitios potencialmente contaminados.



La evaluación de riesgo ecológico es un instrumento que proporciona elementos de juicio adecuados para la toma de decisiones, una vez que se demuestra el efecto en un receptor ecológico.

A diferencia de otros estudios que se han realizado en fauna terrestre (Clark, 1979; Talmage y Walton, 1991; Hontelez *et al.*, 1992; Macnair *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Ieradi *et al.*, 2003; Sumbera *et al.*, 2003; Swiergosz-Kowalewska *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Jasso *et al.*, 2007), donde evalúan un solo nivel de organización biológica, este estudio reunió evidencias de riesgo a diferentes niveles (molecular, individuo, población y comunidad) y/o consideró varios taxones. Por lo cual representa mayor relevancia ecológica.

Objetivo general

- Establecer e implementar una metodología para evaluar riesgo ecológico en fauna terrestre para sitios contaminados, bajo el contexto del diseño e implementación de la metodología integrada de riesgos.

Objetivos particulares

- Determinar los grupos animales que funcionarán como biomonitores, en sitios contaminados con diferentes sustancias tóxicas en sistemas terrestres.
- Establecer biomarcadores de exposición y de efecto en las especies seleccionadas.
- Estandarizar los métodos de laboratorio para analizar los biomarcadores elegidos.
- Evaluar el estado de los individuos, poblaciones y comunidades de las especies seleccionadas en el sitio de estudio.
- Integrar los efectos biológicos desde nivel molecular hasta el de comunidad.

En la Figura 1 se muestra el diseño de la metodología de evaluación de riesgo ecológico para fauna terrestre.

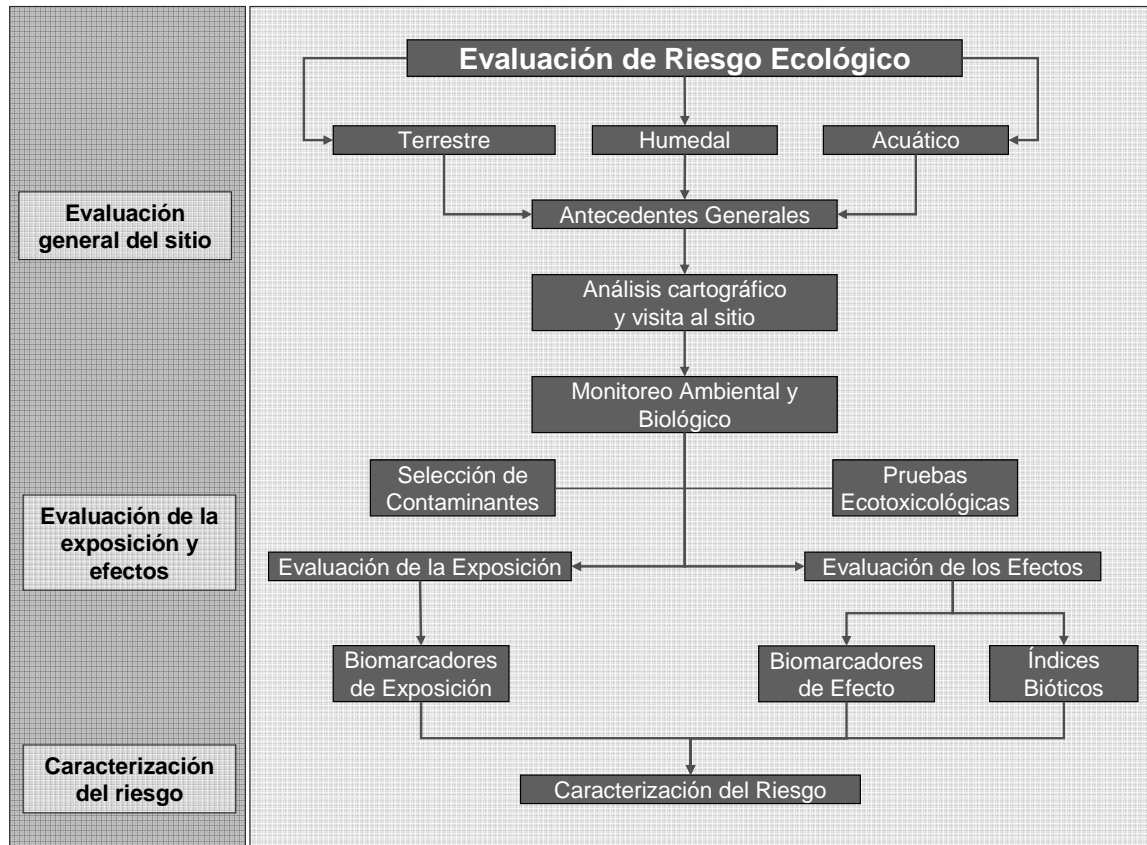


Figura 1.- Modelo conceptual de la metodología de riesgo ecológico para fauna terrestre.

PROBLEMÁTICA GENERAL DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

Se seleccionaron dos sitios para la implementación de esta metodología; el primero fue Villa de La Paz, un municipio situado al norte del estado de San Luis Potosí. Este es un sitio minero en el cual ya se ha demostrado que existe contaminación por metales pesados y arsénico (Razo *et al.*, 2004; Jasso *et al.*, 2007). El segundo sitio de estudio fue Coatzacoalcos en el sureste del estado de Veracruz. En este lugar se encuentran algunos de los complejos industriales más grandes de México, además, el río Coatzacoalcos es considerado por algunos autores como el más contaminado de nuestro país (Challenger, 1998).



Fuentes de contaminación y contaminantes presentes en los sitios de estudio

Villa de la Paz, San Luis Potosí

La minería es una de las actividades industriales más importantes a nivel mundial. Se estima que en el mundo hay por lo menos 10,000 industrias mineras y más de 20,000 sitios mineros, plantas de procesamiento y fundidoras. (UNEP, 2000) A nivel mundial, México es un importante productor de metales (Ag, Au, Cu, Pb, Sn, Zn) y metaloides (As), por lo tanto, la minería es una actividad económica muy importante (SE, 2004; INEGI, 2007; SGM, 2007). Sin embargo, los procesos mineros están considerados como una actividad de alto impacto ambiental, porque son fuentes importantes de metales y metaloides que contribuyen significativamente a la contaminación del suelo, sedimentos, agua y aire. (Nriagu y Pacyna, 1988; Madhavan y Subramanian, 2000; UNEP, 2000)

Villa de la Paz es un sitio minero que tiene aproximadamente 200 años (M. Monroy F., comentario personal) de actividad. De acuerdo con la monografía minera del estado de San Luis Potosí, en el municipio de Villa de La Paz existen tres minas de las cuales se extraen Ag, Au, Cu, Pb y Zn (Anónimo, 1992). Además, en dos de las minas existe arsenopirita. Esta actividad minera ha generado una gran cantidad de residuos, los cuales se han depositado a cielo abierto, por lo que representan un riesgo para la salud humana y la biota.

En época de lluvia, el material es transportado por escorrentías superficiales hasta un arroyo intermitente (Arroyo de la Paz), el cual, a su vez, transporta el residuo minero más de 15 km cuesta abajo, hasta que se introduce al subsuelo a través de fracturas geológicas. En la época seca, el sedimento del arroyo y el material del depósito son transportados por el viento a zonas agrícolas y áreas urbanas vecinas. Es importante hacer notar que la región minera de Villa de la Paz, también afecta al municipio de Matehuala, ciudad de aproximadamente 80 mil habitantes ubicada a 10 km cuesta abajo del depósito minero (Razo *et al.*, 2004).

En cualquier sitio minero son dos las principales fuentes de contaminantes: el proceso primario de tratamiento de metales y la generación de residuos mineros (jales). De acuerdo con Razo *et al.*, (2004) las principales fuentes de contaminación en la región son: presas de jales (residuos del proceso primario del tratamiento de metales y metaloides) históricas y activas, terreros (residuos de roca), emisiones atmosféricas de antiguas plantas de fundición y depósitos históricos de escorias de fundición. En un sitio minero, las principales rutas de exposición pueden ser el material particulado en el aire y las escorrentías; el suelo



contaminado (por el polvo generado desde la mina, por el material proveniente de los jales o por la deposición del material particulado del aire); el polvo contaminado; e inclusive, dependiendo del área geográfica, la contaminación de cuerpos de agua por la escorrentía desde los jales o desde los suelos contaminados. Por lo tanto, las zonas mineras son consideradas sitios potencialmente peligrosos.

La explotación y beneficio de los recursos minerales, históricamente no controlados (desde un punto de vista ambiental), en el distrito minero de Villa de la Paz, ha provocado que se presente una extensa contaminación de suelos y sedimentos por arsénico y metales pesados (Pb, Zn, Cu) en el área de Villa de la Paz-Matehuala, S.L.P. Los análisis químicos de muestras de suelo registraron concentraciones en los intervalos de 19 a 17,384 mg/Kg de arsénico, 15 a 7,200 mg/Kg de cobre, 31 a 3,450 mg/Kg de plomo y 26 a 6,270 mg/Kg de zinc, mientras que en sedimentos de arroyos y de tanques de almacenamiento de agua pluvial las concentraciones encontradas varían de 20 a 28,600 mg/Kg de arsénico, 50 a 2,160 mg/Kg de plomo, 50 a 3,630 mg/Kg de cobre, y 110 a 5,940 mg/Kg de zinc (Razo *et al.*, 2004).

Coatzacoalcos, Veracruz

Coatzacoalcos es una de las principales zonas industriales de México. En este municipio se localizan varios de los complejos petroquímicos más importantes del país. Las principales empresas paraestatales y del sector privado, que cuentan con instalaciones para la producción, almacenamiento y distribución en la zona industrial de Coatzacoalcos son: las filiales de Pemex-Petroquímica (Petroquímica Cangrejera, S. A. de C. V.; Petroquímica Morelos, S. A. de C. V. y Petroquímica Pajaritos, S. A. de C. V.); Pemex-Refinación que posee la terminal marítima y el centro embarcador terrestre, que son instalaciones relevantes para la exportación de crudo y petroquímicos y para el suministro de hidrocarburos y petroquímicos al mercado interno, respectivamente; Pemex-Gas y Petroquímica Básica que operan una terminal refrigerada para el almacenamiento de sus productos; Agronitrogenados, S.A. y A. W. Troy, S.A. que producen y comercializan productos agroquímicos; Cloro de Tehuantepec, S.A. e Industrias Químicas del Istmo, S.A. que elaboran cloro y sosa cáustica, y un grupo de empresas dedicadas a la producción y distribución de productos químicos y petroquímicos, entre las que destacan Celanese Mexicana, S.A., Industrias Cydsa-Bayer, S.A., Grupo Idesa, Resirene, S.A. y Productos Químicos Coin, S.A., y por último Sales del Istmo,



S.A. que produce sal para consumo doméstico e industrial (CECODES, 1988; Anónimo, 2006).

Challenger (1998) menciona que en México la industria petroquímica ha ocasionado daños ecológicos irreversibles en diferentes ecosistemas (humedales, lagos, lagunas, etc.). Ejemplo de ello son las costas de Tabasco y la cuenca del Coatzacoalcos en Veracruz, con altos niveles de solventes, grasas, aceites, fenoles, compuestos azufrados, nitrógeno, mercurio y plomo. En Coatzacoalcos se han registrado diversas sustancias tóxicas como los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) (Stringer *et al.*, 2001), Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) (Riojas-Rodriguez *et al.*, 2008) Compuestos Bromados (Blake, 2005), Dioxinas (Petrlin y DiGangi, 2005) y Metales, (Stringer *et al.*, 2001, Vázquez-Botello, 2004; Rosales y Carranza, 2005) en diferentes matrices ambientales y biológicas. Por otro lado, además de la actividad industrial, se han registrado otros compuestos tóxicos, como el Diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos y otros plaguicidas para controlar los vectores de enfermedades humanas, principalmente el paludismo.

Tanto en Villa de la Paz como en Coatzacoalcos se han registrado contaminantes que tienen la capacidad de provocar daños al ADN (genotoxicidad). En Villa de la Paz hay arsénico y cadmio cuyo efecto genotóxico está bien demostrado (ATSDR, 1999; 2004; 2005a), mientras que en plomo aún existe controversia (ATSDR, 2004; Ramsdorf *et al.*, en prensa). En Coatzacoalcos se han registrado varios contaminantes con potencial genotóxico tales como el DDT (ATSDR, 2002), Hexaclorociclohexano (HCH) (ATSDR, 2005b) y algunos congéneres de Bifenilos Policlorados (PCBs) (ATSDR, 2000; Pérez-Maldonado *et al.*, 2005). Por lo tanto, se eligió la fragmentación de ADN medida por medio del ensayo cometa (ver abajo) como biomarcador de daño al ADN, ya que es sensible a concentraciones bajas de contaminantes. La técnica se ha aplicado en especies de fauna silvestre, es posible realizarla en condiciones de campo. Al ser un biomarcador inespecífico es útil para evaluar mezclas de contaminantes, en algunos casos se ha demostrado causalidad con niveles de organización biológica superiores (Lee y Steiner, 2003).



Daño al ADN

El genoma es el conjunto de genes que contiene la información genética necesaria de un individuo o de una especie, dicha información está codificada en moléculas de ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Estas moléculas constituyen las estructuras físicas llamadas cromosomas. Los componentes básicos del ADN bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina, timina) y azúcares (desoxirribosa) están sujetos a sufrir alteraciones provocadas por compuestos tóxicos, tales como COPs, HAPs y Metales (Albert, 2004). El uso del ensayo cometa también llamado “alkaline single cell-gel electrophoresis” facilita la estimación del daño al ADN, inducido por la exposición a contaminantes presentes en el ambiente (Rajaguru *et al.*, 2003). El nivel de fragmentación del ADN ha sido propuesto como un indicador muy sensible de genotoxicidad, así como un método eficaz para realizar monitoreos ambientales (Shugart, 1990; Balpaeme *et al.*, 1996; Lebailly *et al.*, 1997). El ensayo cometa se caracteriza por ser un método sensible, rápido, simple, barato y aplicable a diversos tipos de células eucariotas (Mckelvey-Martin *et al.*, 1993). El método propuesto por Singh *et al.*, (1988) bajo condiciones alcalinas de electroforesis y lisis (pH > 13) permite el análisis de migración del ADN debido a la rotura de una sola hebra del ADN y sitios álcali-lábiles (Speit y Hartmann, 1999). El ensayo cometa se utiliza ampliamente para detectar en las células individuales, el daño al ADN causado por exposición *in vitro* o *in vivo* de agentes genotóxicos (Fairbairn *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000).

Importancia biológica de las especies animales seleccionadas

En ambos sitios se seleccionaron especies con base en los criterios mencionados en el Anexo 1.

En Villa de la Paz se seleccionaron roedores silvestres.

Roedores

Los roedores son un grupo fundamental en el equilibrio dinámico de las zonas semiáridas del Altiplano Potosino-Zacatecano; forman parte esencial de la cadena alimentaria de estos ecosistemas y también tienen un papel importante en la dispersión de semillas; además, favorecen la formación de manchones de vegetación leñosa, mismos que confieren mayor diversidad a las comunidades vegetales y animales (Espinosa-Reyes, 2005); por lo



tanto, al afectarse las poblaciones y comunidades de roedores, necesariamente se afectan otras especies animales y vegetales. Las características e historia de vida de los roedores favorecen su uso como biomonitores, ya que tienen una distribución geográfica amplia, áreas de actividad pequeñas (Reynolds, 1958). La mayoría de las especies viven en madrigueras (de 40 a 80 cm de profundidad), por lo cual presentan un alto potencial de exposición debido a la ingesta accidental de suelo y polvo. Los roedores son relativamente fáciles de capturar. Tienen un periodo de vida relativamente corto, por lo tanto, se postula que sus poblaciones responden rápidamente a la presencia de nuevos estresores, como por ejemplo la contaminación antropógena.

En Coatzacoalcos se seleccionaron roedores, lombrices de tierra, cangrejos e iguanas.

Lombrices de tierra

La importancia ecológica de las lombrices de tierra radica en que son organismos descomponedores (importantes en los ciclos biogeoquímicos) y por ello, tienen un papel primordial en la adición de nutrientes al suelo (favorece la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y azufre), mismos que pueden ser aprovechados por las especies vegetales (Reines *et al.*, 1998; Legall, 2006); también son un eslabón importante en la cadena trófica, principalmente para algunas especies de aves y se ha demostrado que las lombrices pueden acumular concentraciones importantes de metales (Sánchez-Hernández, 2006). Las lombrices se encuentran en muchos tipos de suelo y son vulnerables a los impactos que ocurren en el suelo, su talla pequeña representa una ventaja para su manejo, su distribución es ubicua en los horizontes edáficos con detritus, son fáciles de capturar, tienen estrecho contacto con el suelo, presentan un ciclo de vida corto -favoreciendo así el estudio de varias generaciones- (Ogunseitan, 2002). En ecología se llama edafón a la biota específica del suelo, en especial a los descomponedores (Odum, 1971). La parte fundamental del edafón consiste en microorganismos procarióticos, hongos y pequeños animales, tales como las lombrices. Por su actividad biológica el suelo alcanza muchos de los rasgos de su composición e incluso de su estructura; y por la actividad metabólica del edafón el suelo es la sede de procesos fundamentales para los ciclos biogeoquímicos, que los mantienen a disposición de la vida.

Los contaminantes orgánicos persistentes tienen la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica, y los animales que forman parte del nivel de



descomponedores o detritívoros son muy importantes para el funcionamiento de un ecosistema, por lo tanto, si los animales que forman parte del edafón son afectados por contaminantes se puede manifestar en la salud de todo el ecosistema.

Cangrejos

Los cangrejos violinistas son ubicuos en todas las regiones tropicales y templadas del mundo. El género más representativo es *Uca*. Los cangrejos miden de 2.5 a 3.0 cm de longitud y se caracterizan por que los machos presentan una enorme quela (pinza) que puede constituir hasta la mitad de su peso corporal (Backwell *et al.*, 2007). En los ecosistemas de humedal son una especie muy importante ecológicamente, ya que juegan un papel primordial en la descomposición de la materia orgánica y la adición de nutrimentos al suelo. Debido a que son una especie que construye sus galerías a la orilla de los ríos o lagunas, pasan una parte de su vida en la superficie terrestre y cuando la marea sube se resguardan en sus madrigueras (\approx 30 cm. de profundidad) quedando debajo del agua. Se alimentan principalmente de detritus, por lo que son excelentes organismos filtradores, capaces de acumular una gran cantidad de contaminantes.

Iguanas

Existen diferentes especies de iguanas, sin embargo las más comunes en la región de Coatzacoalcos son la iguana verde (*Iguana iguana*) y la iguana negra (*Ctenosaura* spp.); La distribución de ambas va desde el sur de México hasta Sudamérica, son especies herbívoras, sin embargo las crías de iguana negra se alimentan de pequeños insectos y crustáceos durante sus primeras semanas en su vida adulta son 100% herbívoras, como las iguanas verdes. De acuerdo con Lara-López y González-Romero, (2002) la dieta de la iguana verde está compuesta de la siguiente manera: hojas (57.36%); flores (24.15%) y los frutos (3.43%). La caza comercial continua y la deforestación, son las dos causas principales de la declinación de las iguanas en su hábitat. En México se encuentran enlistadas en el PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008. En el sur de México (León y Montiel, 2008), en Centroamérica (FAO, 1997) y en algunas partes de Sudamérica la iguana es una de las especies silvestres más consumidas. La FAO (1997) menciona que las iguanas han sido fuente de proteínas para los humanos desde hace más de 7000 años. Muchos de los habitantes rurales de Centroamérica



dependen todavía de la iguana como fuente de proteínas. La carne y los huevos de iguana son considerados como afrodisíacos en numerosas regiones. Debido a que son parte fundamental de la dieta en comunidades rurales, el consumo de carne puede ser una potencial ruta de exposición a contaminantes orgánicos persistentes. Además, por ser una especie arborícola puede ser utilizada para monitorear de manera indirecta la calidad del aire de algunos contaminantes orgánicos volátiles (COVs) y semi-volátiles como el DDT y sus metabolitos, así como algunos congéneres de PCBs.



REFERENCIAS

- Albert, L. 2004. *Toxicología ambiental*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 455 p.
- Anónimo, 1992. *Monografía geológica-minera del estado de San Luis Potosí. Consejo de Recursos Minerales*. Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal. México. 218 p.
- Anónimo, 2006. *Diagnostico situacional Coatzacoalcos*. Gobierno de Coatzacoalcos, Veracruz.
<http://148.235.146.228/NR/exeres/4C719F87-3CCF-4339-913D-7EE780464E94,frameless.htm> (última visita 05 marzo de 2006)
- ATSDR. 1999. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia. USA. 439 p.
- ATSDR. 2000. *Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs)*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 948 p.
- ATSDR. 2002. *Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 497.
- ATSDR. 2004. *Interaction Profile for Arsenic, Cadmium, Chromium and Lead*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia, United States. 181 p.
- ATSDR. 2005a. Toxicological Profile for Arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia. United States. 533 p.
- ATSDR. 2005b. *Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-Hexachlorocyclohexane*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 377 p.
- Aylward Lesa L., Hays Sean M, Karch Nathan J, and Paustenbach Dennis J. 1996. Relative susceptibility of animals and humans to the cancer hazard posed by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-pdioxin Using Internal Measures of Dose. *Environ. Sci. Technol.*, 30:3534-3543
- Balpaeme, K.; Delbeke, K.; Zhu, L.; Kirsch-Folders, M. 1996. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 11, 485–492
- Blake, A. 2005. *The next generation of POP's: PBDE's and Lindane*. International POP's Elimination Network (IPEN). Washington D.C. USA. 15 p.



- Backwell, P.R.Y.; Matsumasa, M.; Double, M.; Roberts, A.; Murai, M.; Keogh, J.S.; Jennions, M.D. 2007. What are the consequences of being left-clawed in a predominantly right-clawed fiddler crab? *Proc. R. Soc. B.* doi:10.1098/rspb.2007.0666. Published online
- CECODES. 1988. *Medio Ambiente en Coatzacoalcos*. Centro de Ecodesarrollo. D. F. México. 86 p.
- Challenger, A., 1998. *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 847 p.
- Clark, D.R. Jr. 1979. Lead concentrations: Bats vs terrestrial mammals collected near a major highway. *Environmental Science and Technology*, 13:338-341
- Collier, T.K. 2003. Forensic Ecotoxicology: Establishing Causality between Contaminants and Biological Effects in Field Studies. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9(1):259-266
- Díaz-Barriga, F. 1999. *Metodología de Identificación y Evaluación de Riesgos para la Salud en Sitios Contaminados*. Organización Panamericana de la Salud. Ops/Cepis/Pub/99.34. Lima, Perú. 42 p.
- Espinosa-Reyes, G. 2005. *Organización de manchones de vegetación leñosa y su relación con roedores en el sur del Desierto Chihuahuense*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 110 p.
- Espinosa-Reyes, G.; Ilizaliturri, C.; González-Mille, D.; Costilla, R.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. DNA Damage in Earthworms (*Eisenia* spp.) as Indicator of Environmental Stress in the Industrial Zone Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health A* (En revisión)
- Espinosa-Reyes, G.; Torres-Dosal, A.; Ilizaliturri, C.; González-Mille, D.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. Wild Rodents (*Dipodomys merriami*) like Biomonitor in Contaminated Mining Sites. *Journal of Environmental Science and Health A* (En revisión)
- Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O' Neill, K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mut. Res.* 339, 37-59.
- FAO. 1997. *Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos*. 2ª Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/V8300S/v8300s00.HTM> (última visita diciembre de 2008)



- Hontelez, L.C.; H.M. van den Dungen; A.J.Baars.1992. Lead and cadmium in birds in the Netherlands: A preliminary survey. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23:453-456
- Hyne, R.V. y Maher, W.A. 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 54:366-374
- Ieradi, L.A.; J. Zima; F. Allegra; E. Kotlánova; L. Campanella; R. Grossi; M. Cristaldi. 2003. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zool.*, 52:57-66
- Ilizaliturri, C.; González-Mille, D.; Pelallo, N; Domínguez, G.; Pérez-Maldonado, I.; Mejía-Saavedra, J.; Batres, L.; Díaz-Barriga, F.; Espinosa-Reyes, G. Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interciencia*. (En revisión)
- INEGI. 2007. Producción minerometalúrgica en México.
<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=ind01&c=1061> (accessed May 2008).
- Jasso-Pineda, Y.; Espinosa-Reyes, G.; González-Mille, D.; Razo-Soto, I.; Carrizales, L.; Torres-Dosal, A.; Mejía-Saavedra, J.; Monroy M.; Ize, A.I.; Yarto, M. and Díaz-Barriga, F. 2007. An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(3), 344-350.
- Lara-López, MS; González-Romero, A. 2002. Alimentación de la iguana verde *Iguana iguana* (Squamata: Iguanidae) en la Mancha, Veracruz, México. *Acta Zool. Mex.*, 85: 139-152
- Lebailly, P.; Vigreux, C.; Godard, T.; Sichel, F.; Bar, E.; Letalaër, J.Y.; Henry, M.; Gauduchon, P. 1997. Assesment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mut. Res.* 375, 205-217.
- Legall, J.R.; L.E., Dicoovski y Z.I., Valenzuela. 2006. *Manual Básico de lombricultura para condiciones tropicales*. Escuela de Agricultura y Ganadería de Estelí. Estela, Nicaragua. 16 p.
- León, P. y Montiel, S. 2008. Wild Meat Use and Traditional Hunting Practices in a Rural Mayan Community of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Hum Ecol*, 36: 249–257



- Macnair, E.B.V.; A.A. Meharg; R.F Shore. 2000. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Environmental Pollution*, 110:179-187
- Madhavan, N. and Subramanian, V. 2000. Sulphide mining as a source of arsenic in the environment. *Current Science*. 78: 702-742.
- Mckelvey-Martin, V.J.; Green, M.H.L.; Schmezer, P.; Pool-Zobel, B.L.; De Méo, M.P.; Collins, A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mut. Res.* 288: 47-63.
- PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. D.O.F. 5 de diciembre de 2008. México D.F. 96 p.
- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*. 333: 134-139.
- Odum, E. 1971. Ecología. 3ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 639 p.
- Ogunseitan, O.A. 2002. *Microbial Proteins as Biomarkers of Ecosystem Health*. 217-232 pp. En: Integrated Assessment of Ecosystem Health. Editado por: Scow, K. M.; Fogg, G.E.; Hinton, D.E.; Jonson, M.L. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, U.S.A. 340 p.
- Pérez-Maldonado, I.N.; Herrera, C.; Batres, L.E.; González-Amaro, R.; Díaz-Barriga, F.; Yañez, L. 2005. DDT induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ. Res.* 98: 177-84.
- Petrlin, J. y DiGangi, J. 2005. *The egg report*. International POP's Elimination Network (IPEN). Washington D.C. USA. 52p.
- Rajaguru, P.; Suba, S.; Palanivel, M.; Kalaiselvi, K. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* 41: 85-91.
- Ramsdorf, W.A.; Ferraro, M.V.M.; Oliveira-Ribeiro, C.A.; Costa, J.R.M.; Cestari, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ. Monit. Assess.* (En prensa)



- Razo, I.; Carrizales, L.; Castro, J.; Díaz-Barriga, F.; Monroy, M. 2004. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, air and soil Pollution.*, 152, 129-152.
- Reines, M.; C. Rodríguez; A. Sierra y M. Vázquez. 1998. *Lombrices de tierra con valor comercial: Biología y técnicas de cultivo*. Universidad de Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo, México. 60 p.
- Reynolds, H. 1958. The ecology of the Merriam kangaroo rat (*Dipodomys merriami* Mearns) on the grazing lands of southern Arizona. *Ecological Monographs*. 28: 110-127.
- Reynolds, K.D.; Schwarz, M.S.; McFarland, C.A.; McBride, T.; Adair, B.; Strauss, R.E.; Cobb, G.P.; Hooper, M.J.; McMurry, S. 2006. Northern pocket gophers (*Thomomys talpoides*) as biomonitors of environmental metal contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:458-469
- Riojas-Rodriguez H.; Baltazar-Reyes, M.C. y Meneses, F. 2008. Volatile organic compound presence in environmental samples near a petrochemical complex in Mexico. *Abstracts Epidemiology*. 19(1): S219.
- Rojas, E.; López, M.C.; Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr B*. 722: 225-254.
- Rosales, L. y Carranza, E. 2005. Estudio geoquímico de metales en el estuario del río Coatzacoalcos. In: *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnostico y Tendencias*. Eds. Vázquez-Botello, A.; Rendón-Von Osten, J.; Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 389-406.
- Sánchez-Hernández, J.C. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 188: 85-126
- SE. 2004. *Informe de la minería Mexicana*. Secretaría de Economía. México. D.F. 51 p.
- SGM. 2007. *Anuario estadístico de la Minería Mexicana ampliada*. Servicio Geológico Mexicano y Secretaría de Economía. México, D.F. 481 p.
- Shugart L.R. 1990. Biological monitoring: Testing for genotoxicity. In: *Biomarkers of environmental contamination*. McCarthy J.F. and Shugart L.R. Eds. Lewis, Boca Raton, FL. USA. 217-227



- Singh, N.P.; M.T. McCoy; R.R. Tice; E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.
- Speit, G. and Hartmann, A. 1999. The comet assay (Single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Method. Mol. Biol.* 113: 203-212.
- Stringer, R.; I. Labunska; K. Bridgen. 2001. *Organochlorine and heavy metals contaminants in the environment around the Complejo Petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, México.* Nota técnica Greenpeace. University of Exeter. Unit Kingdom. 60 p.
- Sumbera, R.; V. Barus y F. Tenora. 2003. Heavy metals in the silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus* (Bathyergidae, Rodentia) from Malawi. *Folia Zool.*, 52:149-153
- Suter II, G.W. 1993. *Ecological Risk Assessment.* Lewis Publishers. United States. 538 pp.
- Suter II, G.W.; Munns, W.R. Jr; Sekizawa, J. 2003. Types of Integration in Risk Assessment and Management, and Why They Are Needed. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9(1): 273-279
- Swiergosz-Kowalewska, R.; M. Gramatyka; W. Reczynsky. 2005. Metals distribution and interactions in tissues of shrews (*Sorex* spp.) from copper and zinc contaminated areas in Poland. *Journal of Environmental Quality.* 34:1519-1529
- Talmage, S.S. y B.T. Walton. 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 119:47-145
- Tice, R.R.; Agurell, E.; Andreson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, F. 2000. Single cell gel / Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mut.* 35: 206-221.
- Torres, A.; Espinosa-Reyes, G.; Ilizaliturri, C.; González, D.J.; Razo, I.; Mejía, J. y Díaz-Barriga, F. 2005. *Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México.* Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005_inf_final_met_integrada.pdf (última visita, julio de 2008)
- Torres, K.C. y M.L. Johnson. 2001. Bioaccumulation of metals in plants, arthropods, and mice at a seasonal wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 20:2617-2626
- UNEP. 2000. *Mining and sustainable development II: challenges and perspectives.* United Nations Environment Programme Division of Technology, Industry and Economics. 96 p.



- Van den Brink, P.J.; Sibley, P.K.; Ratte, H.T.; Baird, D.J.; Nabholz, J.V.; Sanderson, H. 2008. Extrapolation of effects measures across levels of biological organization in ecological risk assessment. 105-133 pp. En: Extrapolation practice for ecotoxicological effect characterization of chemicals. Editado por: Solomon, K.; Brock, T.C.M.; Zwart, D.; Phostuma, L.; Richards, S.M.; Sanderson, H.; Sibley, P.K.; van den Brink, P.J. SETAC Press. Pensacola, Florida, USA. 380 p.
- Vázquez-Botello, A.; S. Villanueva-Fragoso; L. Rosales-Hoz. 2004. *Distribución y contaminación por metales en el Golfo de México*. pp. 682-712. En: Diagnostico ambiental del Golfo de México. Compiladores: Caso, M. I. Pisanty; E. Ezcurra. Editado por: SEMARNAT-INE.



PRIMER ARTÍCULO.- Revisión de las Metodologías sobre Evaluación de Riesgos en Salud para el Estudio de Comunidades Vulnerables en América Latina

Artículo enviado a la revista. *Interciencia*. [En revisión]



Revisión de las Metodologías sobre Evaluación de Riesgos en Salud para el Estudio de Comunidades Vulnerables en América Latina

(Health Risk Assessment Methodologies for the Study of Vulnerable Communities in Latin America)

César Ilizaliturri, Donaji González-Mille, Nadia A. Pelallo, Gabriela Domínguez, Jesús Mejía-Saavedra, Iván Pérez-Maldonado, Lilia Batres, Fernando Díaz-Barriga y Guillermo Espinosa-Reyes*

César Arturo Ilizaliturri Hernández¹. Maestro en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Investigador adjunto.

Donaji Josefina González Mille¹. Maestra en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Investigador adjunto.

Nadia Azenet Pelallo Martínez¹. Maestra en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Investigador adjunto.

Gabriela Domínguez¹. Maestra en Ciencias con especialidad en Química. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Investigador adjunto.

Jesús Mejía Saavedra. Doctor en investigación biomédica básica. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Profesor Investigador.

Iván N. Pérez-Maldonado. Doctor en investigación biomédica básica. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Profesor Investigador¹.

Lilia E Batres Esquivel¹. Licenciada en quimifco-fármaco-biología. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Profesor Investigador.

Fernando Díaz-Barriga Martínez¹. Doctor en Biología Celular. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Profesor Investigador.

Guillermo Espinosa Reyes^{1*}. Maestro en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Investigador adjunto.

¹Centro Colaborante de la OPS/OMS en Evaluación de Riesgos en Salud y Salud Ambiental Infantil. Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

*Correspondencia: Avenida Venustiano Carranza No. 2405, Col Lomas los Filtros, San Luis Potosí 78210, SLP, México. Correo electrónico. Guillermo Espinosa: espinosareyes@gmail.com



RESUMEN

Los métodos para evaluar el riesgo en salud en general se basan en el monitoreo ambiental y en la estimación de la exposición a través de modelos matemáticos. La incertidumbre de tal estrategia es grande. En consecuencia, para incrementar la certidumbre sobre la evaluación de la exposición a los contaminantes, se ha propuesto el empleo de biomarcadores. No obstante, la complejidad de los nuevos escenarios de riesgo obliga a evaluar no solamente a las poblaciones humanas sino también al resto de la biota. Asimismo, factores ambientales, sociales y de salud, al afectar la vulnerabilidad, también deben ser considerados para la caracterización del riesgo. Estos factores de vulnerabilidad pueden evaluarse a través de indicadores. Al final, con los análisis ambientales, el uso de biomarcadores y el manejo de indicadores ambientales, sociales y de salud, puede evaluarse el riesgo de manera integrada (humanos y biota). En esta revisión se presentan las diversas estrategias empleadas para evaluar el riesgo en sitios contaminados, comunidades marginadas y en áreas afectadas por el cambio global climático.

Palabras Clave: Riesgo, Vulnerabilidad, Contaminación

ABSTRACT

The most popular methods for risk assessment are based in environmental analysis and the use of mathematical models for the calculation of exposure doses. However, the uncertainty of this approach is high as the models are based on scenarios that may be not the correct ones. In order to decrease the uncertainty, the use of biomarkers has been proposed. Furthermore, considering the complexity of pollution in some sites, these biomarkers can be use, both in humans and biota in order to obtain better information for the definition of risks in those sites. In addition to biomarkers, social, health and environmental indicators have to be applied for risk characterization as different factors of vulnerability can modify the extent of health risks in some communities. At the end, with environmental monitoring and the use of biomarkers and indicators of vulnerability, we can assess health risks in humans and biota (integrated risk assessment) in different scenarios. In this paper we present the strategies that our group developed for the study of hazardous waste sites, vulnerable communities and areas impacted by climate change.



Resumo

Os métodos para avaliação de risco à saúde têm como base, em geral, o monitoramento ambiental e a estimativa da exposição através de modelos matemáticos. A incerteza de tal estratégia é grande. Em consequência, para se aumentar a certeza sobre a avaliação da exposição aos contaminantes, propõe-se o uso de biomarcadores. Entretanto, a complexidade dos novos cenários de risco obriga a que não somente se avalie as populações humanas como também ao resto da biota. Assim mesmo, fatores ambientais, sociais e de saúde, ao afetar a vulnerabilidade, também devem ser considerados para a caracterização do risco de maneira integrada (humanos e biota). Com esta visão, apresentaremos as diversas estratégias que temos utilizado para avaliar o risco em locais contaminados, comunidades marginalizadas e em áreas afetadas pelas mudanças climáticas globais.



INTRODUCCIÓN

En el campo de la salud ambiental, el término riesgo significa la probabilidad de que un efecto no deseado ocurra como resultado de la exposición a un agente estresante (tóxico, xenobiótico, contaminante, etc). En este contexto, el proceso de evaluación del riesgo se transforma en materia de salud pública y adquiere relevancia. No obstante ello, la evaluación del riesgo no siempre se materializa ya que lograrla implica contar con información de tres factores: i) la fuente del agente estresante (por ejemplo, la fuente de contaminación); ii) el medio por el cual el agente estresante entra en contacto con la población receptora; y iii) la población receptora. Para que exista un riesgo, la población debe entrar en contacto con el tóxico, es decir, debe haber exposición. Sin embargo, para que ocurra un efecto biológico que puede o no terminar en un daño a la salud, normalmente el contacto no es suficiente, sino que se requiere de la entrada del tóxico al organismo del ser vivo expuesto.

En los sitios contaminados es común que la problemática ambiental involucre múltiples factores estresantes y varios medios impactados. Por lo tanto, no resulta extraño que los tomadores de decisión requieran simplificar la complejidad a fin de ordenar, guiar, o diseñar, medidas de intervención que reduzcan los riesgos identificados. En este contexto surgen las metodologías que tienen precisamente como objetivo, la identificación de los riesgos y la determinación de las magnitudes de los riesgos identificados. En esta revisión del tema se presenta el estado del arte de las metodologías para la evaluación de los riesgos en salud con la idea de discutir su utilidad en los países de la región de América Latina.

ESCENARIOS QUE REQUIEREN LA EVALUACIÓN DE RIESGOS

Como ya se señaló, los riesgos en salud se generan por una exposición a agentes estresantes. En general, éstos pueden ser químicos (sustancias químicas contaminantes del ambiente, fármacos, productos industriales, etc), físicos (radiación), o biológicos (microorganismos patógenos). Donde dichos tóxicos se encuentren presentes, habrá la necesidad de realizar una evaluación de riesgos. Sin embargo, desde ahora es importante tomar en cuenta dos factores: i) la concentración del contaminante y ii) la temporalidad de la



exposición. Esto es, la exposición a un agente estresante no basta para que exista un efecto en salud, para que ello ocurra, el agente debe alcanzar su concentración tóxica. Sin embargo, debe considerarse que la concentración tóxica puede ser muy baja si la exposición ocurre en una etapa de vulnerabilidad biológica, como pueden ser las etapas embrionaria, fetal o neonatal (IPCS, 2006). Es así entonces, que normalmente las poblaciones receptoras que merecen nuestra atención son las mujeres embarazadas, los infantes y los niños.

Ahora bien, en un enfoque mas novedoso, el concepto de poblaciones receptoras debe expandirse al resto de la biota; así, en un enfoque de vida silvestre habría que considerar etapas críticas (etapas larvianas, huevos, crías, etc.). En tanto, en un enfoque bajo el concepto de paisaje, debemos tomar en cuenta ecosistemas frágiles o perturbados; y finalmente, en un enfoque ecosistémico, habría que tomar en cuenta la calidad de los recursos.

En este contexto, la presente revisión se enfocará en: i) las metodologías tradicionales de evaluación de riesgos en salud que normalmente se aplican en sitios contaminados por residuos peligrosos; ii) las metodologías de evaluación de riesgos sanitarios que pueden aplicarse en escenarios de alta marginación social; iii) las novedosas metodologías de evaluación integrada de los riesgos en salud para sitios de alta complejidad química; y iv) una nueva propuesta metodológica para evaluar sitios climáticos, estos son, sitios donde la exposición a factores estresantes se incrementa por el cambio global climático.

EVALUACIÓN DE RIESGOS EN SALUD

La necesidad de realizar una evaluación de riesgos en salud en sitios contaminados, bajo una metodología científica, surge en el siglo pasado alrededor de los años 80s, cuando en Estados Unidos se crean leyes y reglamentos para estudiar áreas impactadas por elementos tóxicos. Entonces, tanto la Agencia de Protección Ambiental de aquel país -EPA por sus siglas en inglés- (EPA, 2004), cómo la Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades -ATSDR por sus siglas en inglés- (ATSDR, 2008) generaron opciones metodológicas. Estas opciones parten de una amplia evaluación ambiental (cuantificando tóxicos en los medios involucrados en las rutas de exposición) para después, mediante



definición de escenarios de exposición y tratamiento probabilístico de la información (por ejemplo, modelos aleatorios de simulación Montecarlo), generar estimados cuantitativos de riesgo. Estas metodologías son útiles pero en mayor o menor grado se enfrentan a incertidumbres, siendo una de las mayores la incertidumbre de la exposición.

El no definir el riesgo de manera adecuada puede implicar el gasto innecesario de recursos económicos en la limpieza de un sitio. En América Latina, ante la pobreza, la educación insuficiente, la falta de empleos adecuados bien remunerados, y ante otras muchas carencias sociales, la cuestión ambiental no es prioridad. Es decir, no podemos arriesgarnos a erogar recursos económicos en limpieza de sitios solo por una mala definición de riesgo. Es así que la Organización Panamericana de la Salud (Díaz-Barriga, 1999), encabezó un análisis crítico de las metodologías existentes para mejorarlas disminuyendo su incertidumbre. Como resultado, se propuso el uso de biomarcadores de exposición y de biomarcadores de efecto. Los primeros implican el monitoreo de las sustancias tóxicas o de sus metabolitos en fluidos biológicos o tejidos del individuo supuestamente expuesto. Por ejemplo, no basta en esta metodología, muestrear plomo en suelo sino que también debería realizarse un análisis de plomo en sangre, lo cual certificaría la absorción del compuesto. Por otra parte, el empleo de biomarcadores de daño o de efecto, representan el hecho de que el tóxico ya absorbido ha comenzado a afectar la función celular. Ejemplos de estos biomarcadores de efecto o de daño son: la actividad de enzimas -como las colinesterasas en pacientes expuestos a insecticidas organofosforados- (Joshaghani et al., 2007); la apoptosis -como en niños expuestos al DDT- (Pérez-Maldonado et al., 2004) y; la disminución del coeficiente intelectual como en niños expuestos a plomo (García-Vargas et al., 2001; Canfield et al., 2003).

La evaluación de riesgos en salud se emplea principalmente en sitios contaminados. En México, los sitios peligrosos contaminados con sustancias tóxicas pueden clasificarse en sitios mineros, regiones agrícolas, zonas industriales, campos petroleros, depósitos de residuos o basura, cuerpos de agua contaminados, y áreas afectadas por contaminación natural -yacimientos, volcanes, incendios, etc- (Díaz-Barriga, 1996). Como puede analizarse, la situación en México, quizá con algunas modificaciones puntuales, es similar a lo que ocurre en otras Naciones Latinoamericanas. En consecuencia, en la Región nos enfrentamos a un problema de salud pública, dado que muchos son los sitios peligrosos dónde potencialmente



existen riesgos en salud y entonces debe haber una guía de como evaluarlos. En nuestra experiencia hemos tenido un gran éxito al aplicar los biomarcadores de exposición y de efecto en las metodologías de riesgo. Veamos algunos ejemplos.

En una zona urbana contaminada con arsénico y plomo por una metalúrgica demostramos exposición infantil midiendo plomo en sangre y arsénico en orina (Díaz-Barriga *et al.*, 1993a; Calderón *et al.*, 2001; Carrizales *et al.*, 2006); también registramos daño neuropsicológico asociado al arsénico (Calderón *et al.*, 2001) y utilizando modelajes pudimos definir las rutas de exposición (Carrizales *et al.*, 2006). Con los estudios la empresa actuó y ahora los niveles de plomo en sangre y arsénico en orina en los niños son menores a los de hace 20 años (Carrizales *et al.*, 2006). Este tipo de trabajo lo hemos utilizado en otras zonas metalúrgicas, en una de ellas pudimos evaluar el riesgo retrospectivo utilizando modelaje y valores de plomo en sangre (Díaz-Barriga *et al.*, 1997a), en tanto en otra, las investigaciones fueron la base de la restauración de un pasivo ambiental (Hicks *et al.*, 2006).

La contaminación natural de acuíferos por flúor es un problema de varios países en América Latina, destacan sin embargo, los casos de Argentina o de México. Solamente en la República Mexicana más de seis millones de individuos viven en áreas dónde el agua potable tiene valores altos de este elemento (Díaz-Barriga *et al.*, 1997c). Señalar que el flúor puede representar un riesgo no es fácil, ya que este elemento ha sido ampliamente utilizado por la comunidad médica dental para la protección contra la caries; en consecuencia, definir su toxicidad ha implicado realizar estudios de efectos en salud. Nuestro grupo en una ciudad afectada por este elemento, demostró la exposición infantil a través de la cuantificación del flúor en orina (Grimaldo *et al.*, 1995), el daño por fluorosis dental (Grimaldo *et al.*, 1995), fluorosis esquelética (Calderón *et al.*, 1995), daño reproductivo (Ortíz-Pérez *et al.*, 2003) y alteraciones neuropsicológicas (Rocha-Amador *et al.*, 2007) y por supuesto la contaminación en rutas de exposición y la estimación del riesgo -flúor en agua, flúor en bebidas, flúor en sal, etc.- (Grimaldo *et al.*, 1997; Díaz-Barriga *et al.*, 1997b). Como resultado, en dicha ciudad todas las embotelladoras tienen ya sistemas de potabilización (como ósmosis inversa) y con base en los datos, investigadores de nuestro grupo han propuesto reformas a la normativa para flúor en agua potable, este cambio aparecerá para su revisión en la próxima modificación de las normas



mexicanas para agua potable. Pero quizá la prueba más grande de que los biomarcadores funcionan es un estudio de exposición que efectuamos entre trabajadores de un confinamiento para residuos industriales (Gonsebatt *et al.*, 1995; Díaz-Barriga *et al.*, 1993b). La caracterización ambiental era imposible dado que en el sitio a estudiar había miles de toneladas de residuos industriales de procedencia y contenido desconocidos. Optamos entonces por evaluar la genotoxicidad en los trabajadores expuestos y los resultados fueron alentadores, ya que los trabajadores de mayor antigüedad y potencialmente los más expuestos presentaron los mayores efectos. Ahora bien, el uso indiscriminado de biomarcadores puede traer falsos resultados si no se consideran parámetros toxicocinéticos. Por ejemplo, en niños demostramos que la exposición a deltametrina solo puede medirse antes de los tres días posteriores al contacto con este insecticida piretroide (Ortiz-Pérez, *et al.*, 2005).

En conclusión, la modificación metodológica de la evaluación de riesgos en salud utilizando biomarcadores de exposición y de efecto, disminuye las incertidumbres y permite generar instrumentos de gestión que llevan al diseño de medidas para la reducción de los riesgos. No obstante, esta metodología debe tomar en cuenta que los biomarcadores son tan útiles como su toxicocinética lo permita.

EVALUACIÓN DE RIESGOS SANITARIOS

Si bien no existe una clara definición de lo que son los riesgos sanitarios, la Organización Mundial de la Salud (OMS) identifica algunos del área ambiental (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006). Se calcula que en todo el mundo el 24% de la carga de morbilidad (años de vida sana perdidos) y aproximadamente el 23% de todas las defunciones (mortalidad prematura) se encuentran relacionadas con factores ambientales, pero en los niños de 0 a 14 años, el porcentaje de muertes que podían atribuirse al medio ambiente es de hasta un 36%. En tanto, entre las enfermedades con la mayor carga absoluta atribuible a factores ambientales modificables figuran: la diarrea, las infecciones de las vías respiratorias inferiores y el paludismo. La carga de morbilidad por diarrea está asociada aproximadamente en un 94% con factores de riesgo ambientales tales como el consumo de agua no potable, el saneamiento y la higiene insuficientes (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006). Por su parte, las infecciones de las vías



respiratorias inferiores están asociadas a la contaminación del aire en locales cerrados, relacionada en gran medida con la utilización de combustible sólido en los hogares y posiblemente con la exposición pasiva al humo del tabaco, así como con la contaminación del aire exterior (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006). En los países desarrollados, aproximadamente el 20% de las infecciones respiratorias son atribuibles a causas ambientales, y en los países en desarrollo ese porcentaje llega hasta un 42% (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006). Finalmente, el porcentaje de paludismo atribuible a factores ambientales modificables es de un 42%, y está asociado a las políticas y prácticas de aprovechamiento de tierras, deforestación, ordenación de los recursos hídricos, ubicación de los asentamientos y modificación del diseño de las viviendas (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006).

El agua contaminada y el uso de biomasa al interior de las viviendas son dos prioridades ambientales que urge atender (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006). Las enfermedades diarreicas asociadas a la falta de acceso a agua potable y un saneamiento insuficiente ocasionan aproximadamente 1,7 millones de defunciones cada año. En tanto, el uso doméstico de combustibles de biomasa y carbón por más de la mitad de la población mundial causa 1,5 millones de muertes al año debido a enfermedades respiratorias relacionadas con la contaminación. Aumentar el acceso a mejores fuentes de agua potable, al saneamiento y a una energía limpia son entonces, intervenciones ambientales fundamentales que pueden reducir la presión sobre los ecosistemas causada por la contaminación del agua o del aire, y también mejorar la salud. Las estadísticas de la OMS se presentan en un escenario global, pero es evidente que pueden aplicarse a México y a otros países de la Región.

¿Cómo evaluar riesgos sanitarios? ¿Cómo evaluar riesgos que tienen que ver con la contaminación, con la iniquidad, con la marginación, con la pobreza y con tantos otros factores de desigualdad social? Obviamente no podemos seguir un método tradicional y tampoco podemos emplear las metodologías de evaluación de salud que se han planteado en países desarrollados, como Australia (Beer, 1995) o aquellos de la Unión Europea (Ferguson *et al.*, 1998). Así que en nuestro caso preferimos seguir la evaluación a través del uso de indicadores; y para ello valoramos indicadores sociales, ambientales y de salud. La selección de indicadores se realizó a partir de un análisis detallado de indicadores ya existentes y ampliamente



utilizados (OPS-OMS 2000; CONAPO, 2000; OMS, 2000; Eyles y Furgal, 2000; OPS-OMS, 2001; SSA-PRASA, 2001; DGSA, 2002; PNUMA-OPS, 2003), e introducimos otros indicadores que aún no han sido empleados en el campo de la salud colectiva y que han resultado de nuestros trabajos en comunidades en desafío. Los indicadores seleccionados fueron organizados y clasificados en cuatro dimensiones: 1) Estado de salud, 2) Determinantes de salud, 3) Sistemas y servicios de salud y 4) Ambiental (ver Figura 1). Cabe señalar que de acuerdo a los problemas de salud que se fueron identificando en las diferentes comunidades, nos vimos en la necesidad de realizar un cambio en los indicadores de morbilidad originalmente planteados (alteraciones respiratorias y neuropsicológicas únicamente) para dar pie a la posibilidad de identificar cualquier otro problema de salud de alta prevalencia e importancia en las comunidades, por lo que al final también incorporamos indicadores de alteraciones digestivas, dermatológicas y neurológicas.

En un ejercicio real, lo que nuestro grupo realiza es en primer término el obtener los indicadores y de su análisis encontrar aquellos que están relacionados entre sí. Por ejemplo, porcentaje de marginación, servicios médicos, uso de fogones y leña en interiores, daño respiratorio o genotóxico y enfermedad pulmonar crónica obstructiva. Así, recientemente, nuestro grupo aplicó la metodología en una comunidad indígena de la Región Huasteca (Torres-Dosal *et al.*, 2008). En esta comunidad todos los habitantes empleaban leña para la preparación de sus alimentos en fogatas interiores. El uso de leña genera contaminación en interiores a través del humo (partículas suspendidas, monóxido de carbono, etc.) y a través del hollín (hidrocarburos aromáticos policíclicos -PAHs-, formaldehído, etc.). Al aplicar la metodología demostramos las fuentes contaminantes y además de controlar la principal fuente por medio de una estufa con chimenea (esquema normal de múltiples programas en comunidades indígenas), mejoramos las condiciones de la vivienda limpiando el hollín en techos y pavimentando los pisos de tierra. Al evaluar la exposición (a PAHs y monóxido de carbono) y los efectos biológicos (síntomas respiratorios y genotoxicidad), antes y después de la intervención, demostramos que el programa de intervención fue efectivo y ahora el Gobierno del Estado de San Luis Potosí lo ha venido instrumentando en varias comunidades.

En conclusión, la metodología: 1) identifica riesgos sanitarios y factores de



vulnerabilidad; 2) permite elaborar instrumentos de gestión; 4) diseña programas de intervención en salud, educación y ambiente y 5) reduce los riesgos sanitarios.

EVALUACIÓN INTEGRADA DE RIESGOS

Una buena salud ambiental supone una buena calidad de vida bajo un enfoque ecosistémico; esto es, que el ser humano debe ser tomado en cuenta como un participante más de todo un ecosistema. En consecuencia, los factores ambientales que pueden afectar a la población no se reducen a las sustancias químicas, físicas o biológicas que directamente pueden afectar a la salud, sino también, a aquellos factores que al afectar al ecosistema, afectan la calidad de vida. Entre otros pueden mencionarse al cambio climático, la ruptura y adelgazamiento de la capa de ozono, la desertificación, y la deforestación.

Por razones prácticas, las metodologías de evaluación de riesgo para salud humana y para biota (riesgo ecológico) se han desarrollado de manera independiente; sin embargo, paulatinamente se reconoce cada vez más la exigencia de establecer mejores niveles de protección tanto para el ser humano como para los otros componentes del ambiente. Por esta razón surge la necesidad de diseñar una metodología de evaluación integrada de riesgo que contemple tanto a la población humana como a otros receptores ecológicos en un sólo proceso. En materia ambiental las decisiones no pueden ser completamente adecuadas si únicamente se considera de forma parcial la protección a los humanos o a otras especies de fauna y flora. En muchos casos la contaminación ambiental afecta más a los receptores no humanos, debido a una mayor exposición o dado que estos individuos resultan ser los más sensibles a los efectos negativos (Aylward *et al.*, 1996; Suter, 1993). La falta de integración frecuentemente conduce a que tanto los evaluadores de riesgo humano como de riesgo ecológico, generen evidencias que podrían parecer contradictorias acerca de la naturaleza de los riesgos asociados a un sitio contaminado.

Debido a lo anterior, resulta clara la necesidad de establecer una metodología de evaluación integrada de riesgo, los objetivos de la misma son: i) mejorar la calidad y la eficiencia del proceso de evaluación por medio del intercambio de información entre la salud



humana y los estudios ecotoxicológicos; y ii) proveer mejores argumentos para el proceso de toma de decisiones ambientales. El esquema que sigue nuestra propuesta integrada no pretende conjuntar las metodologías ya descritas de la "Evaluación del Riesgo en Salud" (Díaz-Barriga, 1999; EPA, 2004) y de la "Evaluación del Riesgo Ecológico" (Suter, 1993; EPA, 1994a; EPA, 1994b; EPA, 1998; EPA, 1999) debido a que, de seguir ese camino, se tendría una metodología larga, complicada y costosa. Por el contrario, para el diseño del método integral solamente se han tomado los puntos clave de ambas. Es decir, este esfuerzo integrado debe ser considerado como una propuesta diferente y no, como un sustituto de las metodologías ya descritas. Asimismo, este nuevo diseño se ha gestado tomando en cuenta las limitaciones principalmente económicas, de información y de personal capacitado, que prevalecen generalmente en los países en desarrollo.

En el esquema de la Figura 2 se muestran las diferentes etapas que componen la metodología. En la primera etapa se genera un modelo de sitio, tomando en cuenta las condiciones del área y los tóxicos presentes. Así, se establecen las rutas y entonces se definen las poblaciones receptoras. Para los humanos la definición como población receptora es más sencilla ya que se basa en los puntos de exposición a los contaminantes; pero para la biota, dado el gran número de especies susceptibles al riesgo, la determinación de las especies críticas es un punto clave. Nosotros tomamos como criterios de selección, los siguientes: facilidad de captura, tipo de contaminante, rutas y vías potenciales de exposición, biología conocida de las especies, posición en la red trófica, estatus de conservación y carisma.

En la siguiente etapa se evalúa la exposición en los diferentes receptores a través de: i) un monitoreo ambiental, con la finalidad de determinar las concentraciones de los contaminantes presentes en el sitio (una vez seleccionadas las especies, es importante establecer el grado de contaminación en su hábitat) y ii) biomarcadores de exposición. Ambos casos son de utilidad para el establecimiento de un gradiente de concentración y/o para la elección de sitios de referencia. Para el caso de la biota, en muchos de los casos no es posible encontrar valores de referencia, por lo tanto se deben generar mediante modelos toxicológicos.

Posteriormente se realiza la evaluación de los efectos en las poblaciones en riesgo, para



lo cual se utilizan biomarcadores de efecto (genotóxicos, disruptores endócrinos, etc). Para la evaluación de los efectos en niveles de organización biológica superiores (individuo, población y comunidad) en el escenario ecológico se toman en cuenta características generales de los individuos, parámetros poblacionales e índices bióticos para la comunidad.

Enseguida se realiza la caracterización del riesgo en los diferentes escenarios. Es aquí donde se propone la caracterización integrada del riesgo que permite la asignación conjunta de las magnitudes de los efectos adversos en el sitio de estudio.

Esta metodología ya fue aplicada en el sitio minero de Villa de la Paz, en el Estado de San Luis Potosí, el cual se ha explotado por más de 200 años (Razo *et al.*, 2004). El material que se extrae del subsuelo, rico en sulfuros polimetálicos, ha provocado que se hayan depositado un gran volumen de residuos mineros tipo terreros y jales en los alrededores del poblado ricos en arsénico y plomo, siendo éstos los principales contaminantes del área (Razo, 2004). Las investigaciones realizadas en el área indicaron que la contaminación presente (arsénico) estaba relacionada con el daño al ADN encontrado tanto en los niños habitantes del lugar, así como en aquellos roedores (*Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni*) cuyo hábitat se encuentra en las zonas de mayor concentración de metales (Jasso *et al.*, 2007). Además se demostró: i) una relación entre la exposición y el efecto genotóxico en ambos grupos (niños y roedores) y ii) que los efectos, tanto en humanos como en roedores, eran muy superiores a los encontrados en las poblaciones de baja exposición utilizadas como referencia (Jasso *et al.*, 2007).

La evaluación integrada de riesgo realizada en Villa de la Paz, S.L.P. presenta las siguientes ventajas: i) Coherencia en los resultados.- Esto permite tener bases sólidas para apoyar en la toma de decisiones. Cuando se obtienen resultados inconsistentes derivados de evaluaciones realizadas de manera independiente, la interpretación de los mismos resulta muy complicada. Los resultados obtenidos en Villa de la Paz demuestran que existe el mismo efecto adverso en dos receptores ecológicos distintos (humanos y roedores). ii) Interdependencia.- Una de las razones por las que se relaciona el riesgo ecológico con la salud humana se debe a que todas las actividades del ser humano dependen de los recursos



bióticos. Por lo tanto, si la biota se encuentra afectada y/o en riesgo de estarlo, la salud de la población también puede verse perjudicada. iii) Biomonitores.- Debido a sus hábitos de conducta los roedores se encuentran más expuestos que los humanos, por lo tanto, es posible evaluar otros efectos adversos en biota antes que éstos se presenten en el ser humano. Con los resultados obtenidos hasta el momento se puede afirmar que existe riesgo en salud humana y un potencial riesgo ecológico; sin embargo, en el proceso de integración es deseable el estudio de diversas especies en diferentes sistemas y preferentemente pertenecientes a distintos niveles tróficos. Por lo tanto aún es necesaria la implementación de la evaluación ecológica con mayor profundidad.

EVALUACIÓN DE RIESGOS EN SITIOS AFECTADOS POR CAMBIO CLIMÁTICO

La exposición infantil en los sitios contaminados o en las comunidades marginadas, son tópicos que numerosos grupos han venido trabajando en distintas regiones del mundo. Pero ahora, la salud ambiental enfrenta nuevos retos, uno de ellos, quizá el de mayor riesgo, es el originado por el calentamiento del planeta. Una descripción del concepto de Cambio Global Climático esta fuera de los objetivos del presente trabajo; baste señalar que el incremento en la temperatura ambiental promedio del planeta se ha venido asociando a diversos fenómenos, algunos de los cuales tienen que ver con la salud de todos los seres vivos (IPCC, 2007). Entre los fenómenos asociados a la salud que más nos llaman la atención en el contexto del presente trabajo están tres: i) el aumento en la frecuencia de los desastres naturales (incendios forestales, huracanes, inundaciones, etc.); ii) la aparición de nuevas plagas (como la langosta); iii) la extensión o recrudecimiento de la presencia de vectores asociados a enfermedades humanas (malaria, dengue, etc.); y por supuesto iv) el incremento en la temperatura ambiental promedio.

El primer escenario, el aumento en la frecuencia de los desastres naturales, permite la exposición al humo de los bosques incendiados y a los materiales que se utilizan para su control; facilita la exposición a los sedimentos contaminados de los ríos desbordados, o en áreas urbanas inundadas, a las sustancias químicas que hubieren estado almacenadas en talleres, bodegas, hospitales, industrias, etc. y que fueren impactadas por el desastre. Además,



detrás de una inundación, ocurre exposición a los insecticidas sanitarios que se emplean para prevenir enfermedades transmitidas por vectores.

El segundo escenario, la aparición de nuevas plagas, y el tercer escenario, la extensión de los vectores, implican el uso de nuevos plaguicidas (como el fipronil), o el uso de nuevas mezclas de plaguicidas ya en el comercio (como mezclas de piretroides con organofosforados). La resistencia de plagas y vectores a los insecticidas, podría implicar una mayor aplicación de insecticidas y por ende, facilitar aún más la exposición infantil a estas sustancias químicas.

Finalmente, el cuarto escenario, el aumento de la temperatura implica alteraciones en los procesos de biodegradación por cambio en el tipo de microorganismos o más importante, por un incremento en la volatilidad, sobre todo de los compuestos semivolátiles. Al respecto, es de llamar la atención que en el Sureste de México, donde no se aplica DDT desde el año 2000, se ha venido observando un constante aumento de este insecticida en el aire (Alegria *et al.*, 2006) y en la sangre de la población (Pérez-Maldonado *et al.*, 2006). Una posible explicación del fenómeno es que las inundaciones han permitido remover el suelo y el incremento en la temperatura facilita la volatilidad del insecticida.

En resumen, los escenarios generados por el Cambio Global Climático son los más complejos, dado que abarcan áreas de por sí ya contaminadas y/o ya marginadas; pero donde además, ahora se presentan nuevos riesgos y donde necesariamente deben estudiarse de manera simultánea los efectos en humanos y en biota. Por lo tanto, para evaluar estos sitios, hemos conjuntado las metodologías de evaluación integrada del riesgo en salud con la metodología de evaluación de riesgos sanitarios, y creamos una nueva que hemos denominado: Metodología para Evaluar de Manera Integrada la Salud Ambiental en Niveles de Emergencia (Metodología SANE).

Un nivel de emergencia asociado al cambio climático puede referirse a inundaciones, incendios, aplicación masiva de insecticidas por la aparición de una plaga, o cualquier otro evento que por períodos limitados de tiempo afectan de manera importante a comunidades rurales, áreas naturales protegidas, reservas de la biósfera, regiones indígenas, etc. Es decir



zonas de vulnerabilidad reconocida. La metodología adaptada al cambio climático básicamente consta de dos fases:

1. Descripción del Escenario de Riesgo. El objetivo de esta sección es diseñar un PLAN de estudio para evaluar los riesgos que hubieren sido identificados en la comunidad, a partir de datos oficiales y de información comunitaria. Es obvio que se requiere la visita al sitio y la identificación de rutas de exposición. No obstante, lo primero es lograr la participación de la comunidad, para con ella obtener un listado inicial de preocupaciones, en materia de salud, ambiente, sociedad y ecología. Este listado junto con la información de fuentes diversas, permite generar una propuesta inicial de trabajo.

2. Caracterización Integrada del Riesgo. Teniendo como protocolo el PLAN desarrollado en la sección anterior, el evaluador procederá a obtener información cuantitativa que servirá como BASE de la decisión para establecer programas que lleven a la reducción de los riesgos identificados. En esta etapa se trabaja en los aspectos de i) vulnerabilidad social (educación, servicios médicos, condiciones socioeconómicas, etc.); ii) vulnerabilidad comunitaria (condiciones de los espacios infantiles y tóxicos prioritarios); monitoreo ambiental de contaminantes químicos y microorganismos en rutas de exposición; iii) salud en aspectos clínicos (toxicología clínica); de salud mental (psicología comunitaria -punto fundamental para la evaluación después de un desastre-); y de monitoreo (biomarcadores de exposición y de efecto); y iv) ecología, dónde en especies críticas se valorarán aspectos de exposición y evaluación toxicológica.

Con toda la información puede definirse el nivel de riesgo. Para ésto pueden utilizarse las herramientas y fórmulas de las metodologías tradicionales de evaluación de riesgo (dosis de exposición, cocientes de riesgo, etc.); pero en igual importancia deben plantearse los esquemas de escenarios de riesgo, enfatizando la integración de los indicadores (de salud, ambiente, sociedad y ecología) con los marcadores (ambientales y biológicos) y el peso de la evidencia científica. Dos factores son críticos: i) la identificación y priorización de las rutas de exposición y ii) la priorización de los padecimientos relacionados con los riesgos identificados (punto para el cual el cálculo de los años perdidos por la carga de enfermedad sería una



herramienta decisiva). Como toda metodología de riesgo, ésta concluye con un documento que por su información puede utilizarse como instrumento de gestión.

En conclusión, nuevos retos como el cambio de clima están provocando novedosos escenarios de exposición a factores estresantes (químicos, físicos y biológicos); y así, las metodologías de evaluación de riesgo deberán adaptarse para estudiar vulnerabilidad comunitaria, salud humana y efectos ecológicos, tanto en eventos de urgencia ambiental como en situaciones de mayor plazo. La integración de biomarcadores con el uso de indicadores, pueden ser un camino para lograr la flexibilidad necesaria en este tipo de estudios.

AMÉRICA LATINA

Evaluar el riesgo en salud en sitios contaminados, comunidades marginadas, ecosistemas en peligro o durante eventos de emergencia ambiental, implica realizar una actividad cuyo objetivo es la protección de la salud pública. Esto es relevante para una región como la de América Latina donde aún coexisten dentro de las mismas naciones, una amplia gama de realidades culturales con distintos niveles de desarrollo económico y diferente grado de aplicación de programas en materia de salud ambiental.

Tomando en cuenta los múltiples escenarios que requieren de la evaluación de riesgos, una prioridad Latinoamericana debería ser la formación de cuadros académicos que además tuviesen la capacidad de integrar conceptos de distintas disciplinas. Nuevos problemas añadidos a los de siempre, requieren de una nueva organización, para que así las problemáticas ambientales sean atajadas de manera coordinada no solo por las autoridades ambientales sino también y en conjunto con aquellas, por autoridades de salud. Los escenarios son complejos y la multidisciplinaridad es la única herramienta para evaluarlos.

En este escenario, la Organización Panamericana de la Salud ha jugado un gran papel desde hace ya más de 20 años. La OPS ha promovido cursos de capacitación, ha integrado equipos internacionales de expertos para estudiar sitios contaminados en diferentes naciones, ha apoyado la publicación de manuales y en fin, ha estado en la frontera del desarrollo del área



en la Región. Sin embargo, la Organización deberá mantener su ritmo dado que, como lo planteamos en el presente trabajo, la evaluación de riesgo ha evolucionado y ésto ha ocurrido, porque cada día la complejidad de los problemas ambientales se incrementa, afectando más y más no solamente a los seres humanos sino también al resto de los seres vivos. Pero no todo será responsabilidad de la OPS, al interior de cada país y al interior de cada Institución Académica deben generarse nuevas reflexiones, reflexiones que lleven a esquemas de trabajo inéditos en el área y por ende, a la integración de nuevos equipos de profesionistas.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos señalados en este documento se han realizado sobre todo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (SEMARNAT-2004-01-0238) y gracias al trabajo en colaboración con la Organización Panamericana de la Salud (Proyecto OPS-GEF-DDT).



BIBLIOGRAFÍA

- Alegria H, Bidleman TF, Figueroa MS (2006) Organochlorine pesticides in the ambient air of Chiapas, Mexico. *Environ. Pollut.* 140 :483-91.
- ATSDR (2008) Public Health Assessment Guidance Manual. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- Aylward LL, Hays SM, Karch NJ, Paustenbach DJ (1996) Relative Susceptibility of Animals and Humans to the Cancer Hazard Posed by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-pdioxin Using Internal Measures of Dose. *Environ. Sci. Technol.* 30:3534-3543.
- Beer T, Ziolkowski (1995) *Environmental Risk Assessment. An Australian Perspective. Commonwealth Australia.* Supervising Scientist. Australia. 125 pp.
- Calderón J, Romieu I, Grimaldo M, Hernández H y Díaz-Barriga F (1995) Endemic fluorosis in San Luis Potosí, México. II. Identification of risk factors associated with occupational exposure to fluoride. *Fluoride.* 28:203-208.
- Calderón J, Navarro ME, Jiménez-Capdeville ME, Santos-Díaz MA, Golden A, Rodríguez-Leyva I, Borja-Aburto VH y Díaz-Barriga F (2001) Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res.* 85: 69-76.
- Canfield RL, Henderson CR, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP (2003) Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 micrograms per deciliter. *N Engl J Med.* 348:1517–1526.
- CONAPO (2000) *Índice de Marginación a nivel de Localidad.* Consejo Nacional de Población. México.
- Carrizales L, Razo I, Tellez-Hernandez JI, Torres-Nerio R, Torres A, Batres LE, Cubillas AC, Diaz-Barriga F (2006) Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environ Res.* 101:1-10.
- DGSA (2002) *Primer Diagnóstico Nacional de Salud Ambiental y Ocupacional.* Dirección General de Salud Ambiental; Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios. 105 pp.
- Díaz-Barriga F, Santos MA, Mejía JJ, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Vera E, Del Razo LM y Cebrían ME (1993a) Arsenic and cadmium absorption in children living near a smelter



- complex in San Luis Potosí, Mexico. *Environ. Res.* 62: 242-250.
- Díaz-Barriga F, Santos MA, Yáñez L, Cuéllar JA, Gómez H, García A, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Pérez A y Ruíz E (1993b) Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 3:63-71.
- Díaz-Barriga F (1996) Los residuos peligrosos en México. Evaluación del riesgo para la salud. *Salud Pública de México.* 38: 280-291.
- Díaz-Barriga F, Batres L, Calderón J, Lugo A, Galvao L, Lara I, Rizo P, Arroyave ME y McConnell R (1997a) The El Paso smelter twenty years later: residual impact on Mexican children. *Environ. Res.* 74:11-16.
- Díaz-Barriga F, Leyva R, Quistián J, Loyola-Rodríguez JP, Pozos A y Grimaldo M (1997b) Endemic Fluorosis in San Luis Potosí, México. IV. Sources of Fluoride Exposure. *Fluoride.* 30:219-222.
- Díaz-Barriga F, Navarro-Quezada A, Grijalva M, Grimaldo M, Loyola-Rodríguez JP y Ortiz MD (1997c) Endemic Fluorosis in México. *Fluoride.* 30:233-239.
- Díaz-Barriga F (1999) *Metodología de Identificación y Evaluación de Riesgos para la Salud en Sitios Contaminados.* Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/CEPIS/PUB/99.34. Perú, World Health Organization. 96 pp.
- EPA (1994a) *Field Studies for Ecological Risk Assessment.* ECO Update 2(3):1-13. U.S. Environmental Protection Agency.
- EPA (1994b) *Selecting and using Reference Information in Superfund Ecological Risk Assessments.* ECO Update 2(4):1-6. U.S. Environmental Protection Agency.
- EPA (1998) *Guidelines for Ecological Risk Assessment.* Environmental Protection Agency. USA. 112 pp.
- EPA (1999) *Screening Level Ecological Risk Assessment Protocol Appendix E: Toxicity Reference Values U.S. EPA Region 6.* Multimedia Planning and Permitting Division Center for Combustion Science and Engineering. U.S. EPA. Office of Solid Waste.
- EPA (2004) *Risk Assessment Guidance for Superfund, Volume I - Human Health Evaluation Manual* Environmental Protection Agency (EPA). <http://www.epa.gov/superfund/index.htm>. (Accesado el 14/Abr/2004).



- Eyles, J., y Furgal, C (2000) *Indicators in Environmental Health: Identifying and Selecting Common Sets*. Trabajo preparado para la Conferencia de la Comisión Internacional Conjunta “Conferencia de Consenso en la Vigilancia de la Salud Ambiental: Acordando Conjuntos Básicos de Indicadores y su Uso Futuro”, Cd. De Québec, 10-12 de octubre del 2000. Comisión Internacional Conjunta, Ottawa, ON.
- Ferguson, C., Darmendrail, D., Freier, K., Jensen, B.K., Jensen, J., Kasamas, H., Urzelai, A. and Vegter, J (1998) *Risk Assessment for Contaminated Sites in Europe. Volume 1. Scientific Basis*. LQM Press, Nottingham. 165 pp.
- García-Vargas GG, Rubio-Andrade M, Del Razo LM, Borja-Aburto, Vera- Aguilar E, Cebrián ME (2001) Lead exposure in children living in a smelter community in region Lagunera, Mexico. *J. Toxicol. Environ. Health*. 62:417-429.
- Gonsebatt ME, Salazar AM, Montero R, Díaz-Barriga F, Yáñez L, Gómez H y Ostrosky-Wegman P (1995) Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in Mexico. *Environ. Health Perspec.* 103 Suppl 1:111-113.
- Grimaldo M, Borja V, Ramírez AL, Ponce M, Rosas M y Díaz-Barriga F (1995) Endemic fluorosis in San Luis Potosí, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride. *Environ. Res.* 68:25-30.
- Grimaldo M, Turrubiartes F, Milan J, Pozos A, Alfaro C y Díaz-Barriga F (1997) Endemic fluorosis in San Luis Potosí, Mexico. III. Screening for fluoride exposure using a geographic information system. *Fluoride*. 30:33-40.
- Hicks MO, Sanín-Aguirre LH, Díaz-Barriga F, Reza-López SA and Romieu I (2006) Risk assessment in an old lead smelter complex in Chihuahua, Mexico. *Tecnociencia*.1:26-35.
- IPCS (2006) *Principles for evaluating health risk in children associated with exposure to chemical. Environmental Health Criteria*. International Programme on Chemical Safety (IPCS). 237 pp.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Geneva, Switzerland. 104 pp.
- Jasso-Pineda Y, Espinosa-Reyes G, Gonzalez-Mille D, Razo-Soto I, Carrizales L, Torres-Dosal A, Mejía-Saavedra J, Monroy M, Irina Ize A, Yarto M y Díaz-Barriga F (2007) An Integrated



Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3:344–350.

Joshaghani HR, Ahmadi AR, Mansourian AR (2007) Effects of occupational exposure in pesticide plant on workers' serum and erythrocyte cholinesterase activity. *Int J Occup Med Environ Health.* 20:381-385

OMS (2000) *Environmental Health Indicators: Development of a Methodology for the WHO European Region.* (Informe Interino, 18 de diciembre del 2000). Organización Mundial de la Salud. Bilthoven, Países Bajos: Oficina Regional de la OMS - Europa, Centro Europeo para el Ambiente y la Salud.

OPS/OMS (2000) *Pan American World Health Organization PAHO / WHO Report of the First Binational Workshop on Environmental Health Indicators.* Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Ciudad Juárez, 6-7 de junio del 2000.

OPS/OMS (2001) Encuesta Sobre Salud Ambiental (ESA). Infraestructura y Recursos Humanos de los Estados de la Frontera Norte México. Organización Panamericana de la Salud, Oficina de Campo, Frontera México-Estados Unidos. El Paso, Texas, 1999-2000.

Ortiz-Pérez D, Rodríguez-Martínez M, Martínez F, Borja-Aburto VH, Castelo J, Grimaldo JI, De la Cruz E, Carrizales L y Díaz-Barriga F (2003) Fluoride-induced disruption of reproductive hormones in men. *Environ. Res.* 93:20-30.

Ortiz-Pérez MD, Torres-Dosal A, Batres LE, López-Guzmán OD, Grimaldo M., Carranza C, Pérez-Maldonado IN, Martínez F, Pérez-Urizar J y Díaz-Barriga F (2005) Environmental Health Assessment of Deltamethrin in a Malarious Area of Mexico: Environmental Persistence, Toxicokinetics and Genotoxicity in Exposed Children. *Environ. Health Perspec.* 113:782-786.

Pérez-Maldonado IN, Díaz-Barriga F, de la Fuente H, González-Amaro R, Calderón J y Yáñez L (2004) DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ. Res.* 94: 38-46.

Pérez-Maldonado IN, Athanasiadou M, Yanez L, Gonzalez-Amaro R, Bergman A, Diaz-Barriga F (2006) DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite. *Sci. Total Environ.* 370:343-351.



- PNUMA-OPS (2003) *Evaluación Integral de Ambiente y Salud en América Latina y el Caribe*. IEAH/GEO Salud. Sep-2003. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente/Organización Panamericana de la Salud, Fundación Oswaldo Cruz.
- Prüss-Üstün A, Corvalán C (2006) *Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease*. World Health Organization. 104 pp.
- Razo I, Carrizales L, Castro J, Díaz-Barriga F y Monroy M (2004) Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air and Soil Poll.* 152:129-152.
- Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, Morales R and Calderon J (2007) Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad. Saúde Pública.* 23:579-587.
- SSA/PRASA (2001) *Programa de Acción en Salud Ambiental*. Plan Nacional de Desarrollo 2000-2006. Secretaría de Salud.
- Suter II, G.W (1993) *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers. United States. 538 pp.
- Torres Dosal A, Pérez-Maldonado IN, Jasso-Pineda Y, Martínez Salinas RI, Alegría Torres JA, Díaz-Barriga F (2008) Indoor air pollution in a Mexican indigenous community: Evaluation of risk reduction program using biomarkers of exposure and effect. *Sci. Total Environ.* 390:362-8.



Figura 1. Indicadores de Vulnerabilidad utilizados en Comunidades en riesgo.

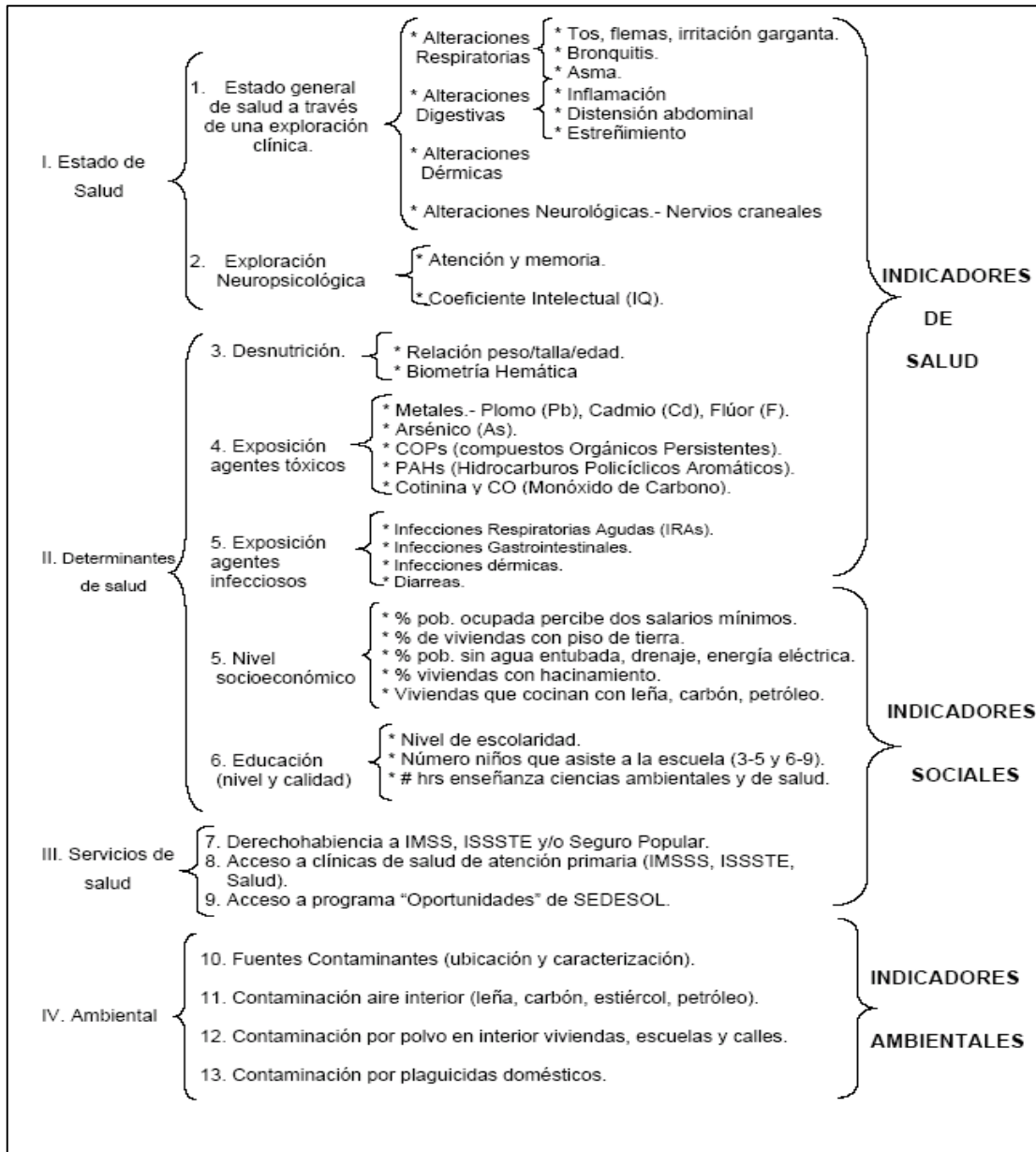
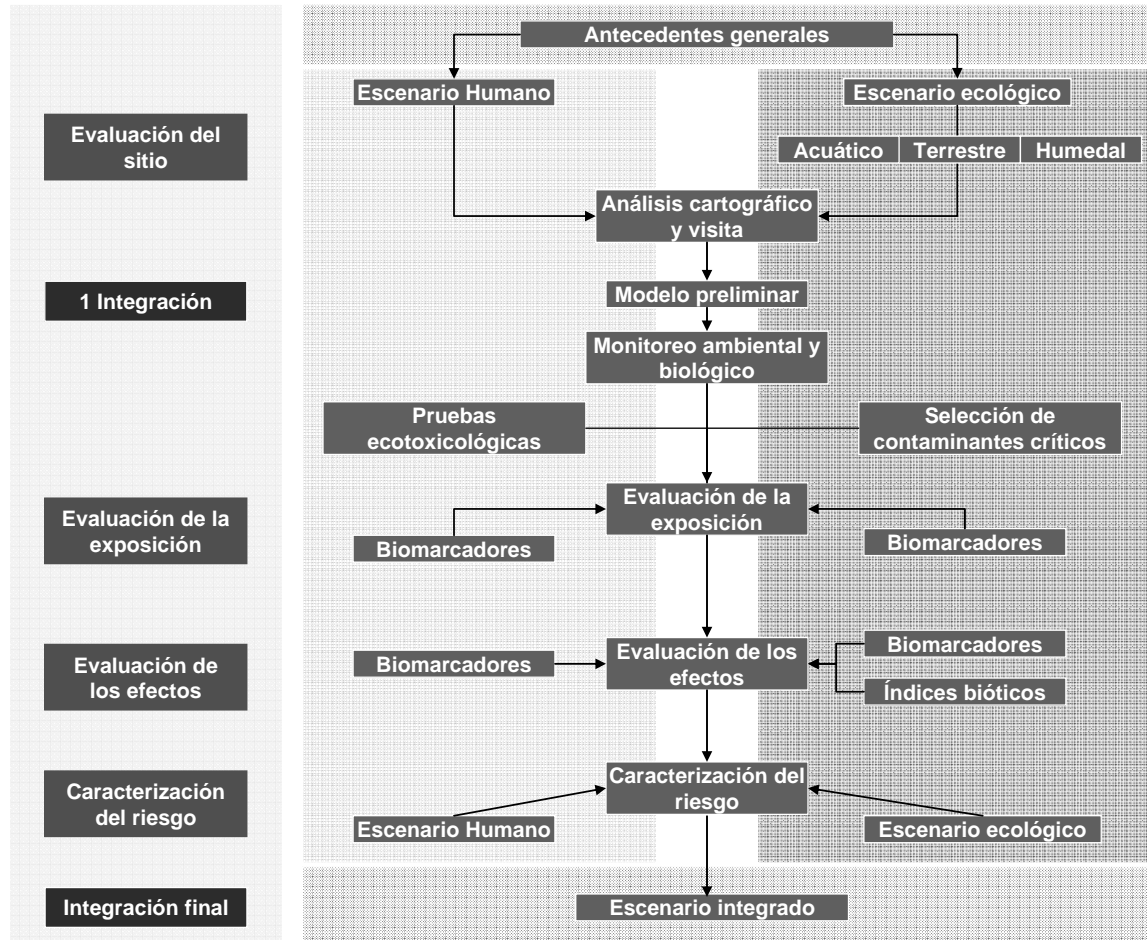




Figura 2. Diseño para la Evaluación Integrada de Riesgos.





SEGUNDO ARTÍCULO.- An Integrated Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead

Artículo publicado en el año 2007 en la revista *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3): 344-350



An Integrated Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead

Yolanda Jasso-Pineda[†], Guillermo Espinosa-Reyes[†], Donají González-Mille[†], Israel Razo-Soto[‡], Leticia Carrizales[†], Arturo Torres-Dosal[†], Jesús Mejía-Saavedra[†], Marcos Monroy[‡], Ana Irina Ize[§], Mario Yarto[§] and Fernando Díaz-Barriga^{†*}

[†]Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. CP 78210

[‡]Instituto de Metalurgia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. CP 78210

[§]Instituto Nacional de Ecología (INE) México D. F. CP 04530

Running head: Heavy Metals and Integrated Risk Assessment

“*To whom correspondence may be addressed”: Fernando Díaz-Barriga. Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Venustiano Carranza 2405, Col. Lomas Los Filtros, CP 78210, San Luis Potosí, SLP, México. Telephone and Fax: (52-444) 826-2354. E-mail: fdia@uaslp.mx



ABSTRACT

In order to test the value of an integrated approach for the analysis of health risks at contaminated sites, an integrated health risk assessment in a mining area was performed following three steps: (A) environmental monitoring of surface soil; (B) assessment of exposure to metals in children and native rodents; and (C) DNA damage evaluation (comet assay) in those children and rodents. These aspects were also studied in less exposed populations. Our results in humans showed that children living in the most polluted area (Villa de la Paz) had higher lead blood concentrations (geometric mean of 13.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$) and urinary arsenic levels (geometric mean of 52.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine) compared to children living in a control area (Matehuala) (blood lead of 7.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$; urinary arsenic of 16.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine). Furthermore, the exposed children also had increased DNA damage (tail moment mean in Villa de la Paz of 4.8 vs 3.9 in Matehuala; $p < 0.05$). Results in rodents were identical: animals captured in the polluted area had higher levels of arsenic (geometric mean of 1.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ in liver and 1.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ in kidney), lead (0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ in liver and 0.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ in kidney), and cadmium (0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ in liver and 2.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ in kidney), while they also had increased DNA damage (tail moment mean of 18.2) when compared to control animals (arsenic in liver of 0.08 $\mu\text{g}/\text{g}$ and kidney of 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$; lead in liver of 0.06 $\mu\text{g}/\text{g}$ and kidney of 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$; cadmium in liver of 0.06 $\mu\text{g}/\text{g}$ and kidney of 0.6 $\mu\text{g}/\text{g}$; and tail moment of 14.2). With the data in children and rodents the weight of evidence for health risks (in this case DNA damage) associated with metal exposure in Villa de la Paz, was strengthened. Therefore, a remediation program was easier to justify, and a feasibility study at this site is under way.

Keywords: Metals, Comet assay, Integrated risk assessment



INTRODUCTION

The term "integration" has many meanings, and several opportunities exist within risk assessment for integration. In this context, the International Program of Chemical Safety (IPCS) has defined the concept of integrated risk assessment as "a science-based approach that combines the processes of risk estimation for humans, biota, and natural resources in one assessment" (IPCS 2001). Two fundamental reasons for integrated risk assessment are: 1) to improve the quality and efficiency of assessments through the exchange of information between human health and environmental risk assessors; and 2) to provide more coherent inputs in the decision-making process (IPCS 2001). With respect to the latter, human health and ecological risk assessors often provide decision makers with inconsistent input, which results in contradictory impressions of the nature of risks. This result from differences in approach should be eliminated in an integrated approach (IPCS 2001).

In this context, we designed an integrated health risk assessment approach for mining areas, since mining, one of the most important sources of environmental toxicants, contributes significantly to the national economy of 158 countries (UNEP 2000a). This design includes an environmental assessment together with the study of the exposure to heavy metals and the analysis of DNA damage in both children and local fauna (rodents).

Millions of people are exposed to metals in mining areas. For example, it has been estimated that miners represent approximately 1% of the global workforce, or about 30 million workers (Joyce 1998). To this total we have to add 11-13 million people for whom artisanal mining represents their livelihood (UNEP 2000b). Occupational health risks in the mining industry have been extensively studied (Fisher 1998); however, little is known about the health risks of children exposed to metals in mining areas. Most studies concerning children living in mining or smelter sites are limited to exposure assessments (Díaz-Barriga et al. 1993; Díaz-Barriga et al. 1997; Hwang et al. 1997; Murgueytio et al. 1998; Yáñez et al. 2003). Few of them have described biological effects in the exposed children (Counter 1997; Calderon et al. 2001; Yáñez et al. 2003). If we assume that around 40 million individuals are working in the mining industry, then, millions of children (including the children of the miners) may be



directly exposed to the environmental impacts associated with the mining industry. Thus, it is clear that more studies are urgently needed in regard to children's health in mining areas.

With regard to rodents, heavy metal toxicity has been studied extensively at the experimental level (ATSDR 2005a; ATSDR 2005b); furthermore, the toxicity of simple and complex mixtures has been determined in rodents, showing higher effects than those found with their individual components (ATSDR 2004). Therefore, it is not unusual that, in the assessment of sites contaminated with metals, some protocols have included native small mammals as representatives of wildlife (Talmage 1991; Erry et al. 2000; Milton et al. 2003).

Considering the genotoxic effects of lead and arsenic, in our integrated approach, DNA damage was chosen as the toxicological endpoint (Valverde et al. 2000; Valverde et al. 2002). In mining areas, DNA damage has been studied (although separately) by others in wild rodents (Husby et al. 1999; Da Silva et al. 2000; Festa et al. 2003) and children exposed to metals (Yáñez et al. 2003).

Taking into account all the above points and in order to test the value of an integrated approach for the analysis of health risks in contaminated sites, we performed in the present study an integrated health risk assessment in a mining area following three steps: (A) environmental monitoring of surface soil; (B) assessment of exposure to metals in children and native rodents; and (C) DNA damage evaluation in those children and rodents. These aspects were also studied in less exposed populations.

MATERIALS AND METHODS

Study Areas

Villa de la Paz is a mining site where different ore deposits have been mined over the last 400 years. A preliminary analysis of the metal concentration in the tailings located in Villa de la Paz (Rodríguez et al. 1998), has reported arsenic (9647 ppm), manganese (1650 ppm), zinc (1350 ppm), copper (1180 ppm), lead (690 ppm), nickel (150 ppm) and cadmium (17 ppm). Studies of soil samples reported concentrations of 19–17 384 mg/kg As, 15–7200 mg/kg



Cu, 31–3450 mg/kg Pb and 26–6270 mg/kg Zn (Razo et al. 2004). Meanwhile, the concentrations in dry stream sediment samples were found to vary 29–28,600 mg/kg As, 50–2160 mg/kg Pb, 71–2190 mg/kg Cu, and 98–5940 mg/kg Zn (Razo et al. 2004). The results suggest that arsenic and heavy metal dispersion from their pollution sources (historical and active tailing impoundments, waste rock dumps and historical slag piles), is mainly associated in this site with: (1) fluvial transportation of mine waste through streams that cross the area in W–E direction; and (2) aeolian transportation of mineral particles in SW–NE direction. The site impacted by arsenic and heavy metals has an area of 105 km². In the urban area of Villa de la Paz, the mining facility contains a raw mineral breaker and a mining waste disposal site (mining tailings) (Figure 1). The exposure of children to arsenic and lead in Villa de la Paz has been previously reported (Yáñez et al. 2003).

Environmental Monitoring

We took soil samples from areas repeatedly used by children (schools and recreational areas) and at those sites where rodents were collected. For areas used by children, a systematic sampling within a 400 m grid was undertaken at three sites: the urban area of Villa de la Paz, the community of Real de Minas (closest urban community to the mining waste disposal site), and Matehuala (control community). For areas where rodents were collected, sampling within a 2.0 m grid was defined for two sites, Villa de la Paz (an area next to the urban site) and a control area against prevailing winds (Figure 1). Samples of surface soil (1–5 cm in depth) were obtained with a stainless steel scoop on an approximately 1 m² surface area and stored in polyethylene bags.

>>>>FIGURE 1 HERE>>>>

Selection of Children

The studies involving humans were conducted in accordance with national and institutional health guidelines for the protection of human subjects. In Villa de la Paz, Real de Minas and Matehuala, children attending schools in the area were selected at random from among those who met the inclusion criteria. Healthy children (as stated by the parents) aged 4 to 11 years, who had at least 3 years of residence in their particular area were considered for the study. Sixty children were selected for the study. All of them decided to participate in the



study. The socioeconomic index of Villa de la Paz is 0.76, while the index of Matehuala is 1.2 (CONAPO 2000). Both locations have been classified as communities with a low level of margination (CONAPO 2000). The parameters considered in the construction of this index were: academic level, housing conditions and income (CONAPO 2000). All parents filled out an exposure questionnaire modified from a questionnaire previously used in Mexico (Carrizales et al. 2006). Among the major non-environmental determinants of lead exposure: "mother cooks in lead-glazed pottery," "hand-to-mouth activities," and "child bites colored pencils" were assessed through this questionnaire. Blood was obtained by venous puncture using lead-free tubes containing EDTA as anticoagulant. First void urine samples were collected, stored in plastic bottles, and kept frozen until analysis.

Collection of Rodents

The studies involving experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of animal subjects. Sherman traps for live capture were used during two consecutive nights; 40 traps were placed in a grid of 5 x 10 m. Ten rodents were captured in Villa de la Paz while in the control area 11 animals were collected. However, in the present study we only examined species of the Heteromyidae family, as this granivorous family is the most abundant in the region and the species (*Chaetodipus nelsoni* Merriam 1894 and *Dipodomys merriami* Mearns 1890) have similar ethologic habitats. The captured animals were weighed and sex was determined before sending them to the laboratory where they were sacrificed by decapitation one day later; blood samples, liver and kidneys were obtained.

Analytical Methods

Soil samples were oven dried at 30°C for 1 to 2 days. The < 600-µm fraction was separated with a 28 mesh Tyler Series sieve. Soil samples were acid digested (25 % HNO₃) for 30 min under 80 psi pressure using a CEM MDS-2000 microwave extraction system. After digestion, the extracted solution was filtered through Whatman filter paper with 11 µm pore diameter. Arsenic was analyzed by flame atomic absorption spectrometry using a Perkin Elmer Analyst 100 atomic absorption spectrometer coupled to a Perkin Elmer FIAS 100 hydride generation system. Analysis for lead, cadmium, copper and zinc in soil were carried out by



flame atomic absorption spectrometry using a Varian Spectra AA 220 atomic absorption spectrometer. Analysis of primary standard reference material in each run was conducted as an internal quality control. For soil, NIST-SRM 2710 and 2711 (Montana soil) were used with recoveries of 97% at 98%. The linear quantification procedure had the following coefficients of variation: cadmium 5.6-11.2% (range of 1-10 ppb), arsenic 3.1-4.8% (range of 1-80 ppb), and lead 2.1-2.8% (range of 1-80 ppb).

For children, an aliquot of urine (5.0 mL) was wet digested with nitric and perchloric acids according to Cox (1980). Arsenic was analyzed by atomic absorption spectrometry using a Perkin Elmer Analyst 100 atomic absorption spectrometer coupled to a Perkin Elmer FIAS 100 hydride generation system. As quality control, NIST-SRM 2670 urine standard reference materials were obtained from the National Institute of Standards and Technology (USA), with recoveries of 95%. The urinary arsenic concentration was standardized to urinary creatinine. Urinary creatinine was determined by the Jaffe colorimetric method (Brown 1986). Blood lead levels were determined with a matrix modifier (diammonium hydrogenphosphate-Triton X-100 in the presence of 0.2% nitric acid) according to Subramanian (1987) and the samples were analyzed with a Perkin-Elmer 3110 atomic absorption spectrophotometer using a graphite furnace. At the time of the study, our laboratory was participating in the blood lead proficiency testing program of the Centers for Disease Control (CDC).

With regard to rodents, the animals were sacrificed by decapitation; rodent whole blood was obtained using lead-free tubes containing EDTA as anticoagulant. The liver and kidneys were immediately removed and without delay perfused with 10 mM Tris pH 7.2. Tissue samples of liver and kidney were placed in acid-washed glass test tubes and solubilized with a mixture of nitric and perchloric acids, for at least 9 h. Arsenic was determined by atomic absorption spectrometry, using a Perkin Elmer Analyst 100 spectrometer coupled to a Perkin Elmer FIAS 100 HGS. Lead and cadmium analysis were performed using atomic absorption spectrophotometry with a Perkin Elmer model 3110 coupled to a graphite furnace. As quality control, blind random samples of NBS-Bovine liver 1577a, standard reference material, were analyzed; the percent recovery values were better than 95% for arsenic and lead.



Comet Assay

Single cell gel electrophoresis was performed as described by Singh et al. (1988). A whole blood sample (obtained at the same time as the samples used for the exposure assessment to metals), are suspended in a layer of 0.5% low-melting-point agarose (37°C) and were placed on a precoated slide with a layer of 0.5% regular agarose. After the agarose has solidified the cells are placed in a lysis solution consisting in 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl and 0.1 M Na₂EDTA, pH 10; to which 10% DMSO and 1% Triton X-100 were added just before use. The solution is chilled prior to use and the lysis duration was a maximum of 24 hours at 4°C. Slides are incubated in an alkaline buffer (300 mM NaOH and 10 mM Na₂EDTA pH >13) for 20 min. After alkali incubation, the electrophoresis was performed in the same buffer (pH >13) for 20 min at 25 V and 300 mA. All procedures were performed under very dim indirect light and conducted at temperature of 4°C. After electrophoresis, slides were gently washed with 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), and then dehydrated in ethanol. The slides were stained with ethidium bromide (20 µl of a 20 µg/ml solution), and a coverglass was placed over the gel. The basal level of DNA damage in leukocytes was analyzed in 100 cells (50 randomly selected cell nuclei by duplication) using an epifluorescent microscope (Nikon Eclipse E400). The comet image magnification was 200x. Olive tail moment [(tail mean – head mean) x tail %DNA/100] was measured by image analysis (Komet - version 4, Kinetic Imaging Ltd.). Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion and was always >95%. All slides were independently coded before analysis (they were scored without knowledge of the code). For rodents we followed the same method used for humans, except that 20 µl of blood was used.

Statistical Analysis

For humans, differences between mean values of metal concentrations in soil samples, blood lead levels (PbB), urinary arsenic concentrations (AsU) and olive tail moment, were assessed by one-way ANOVA, followed by the LSD test for comparison among groups. All values were log transformed to stabilize the variance and to better achieve a normal distribution. With rodents, differences between mean values of metal concentration in soil samples, metals in rodent tissues and olive tail moment were assessed by the t-test for independent groups. Only values of rodent tissues were log transformed to stabilize the



variance and to better achieve a normal distribution. In both cases the level of statistical significance was $p < 0.05$. All analyses were conducted using STATISTICA version 6.0.

RESULTS

Table 1 shows that the area of Villa de la Paz had arsenic ($p < 0.05$), lead ($p < 0.05$), cadmium ($p < 0.05$), copper ($p < 0.05$) and zinc ($p < 0.05$) levels in surface soil higher than the control area of Matehuala. With regard to the area of Real de Minas, located next to the tailing deposit, the only difference when compared to the results in Matehuala were the levels of lead which were lower ($p < 0.05$). It is important to mention that the concentrations of 400 mg/kg for lead and that of 100 mg/kg for arsenic in soil, are intervention guideline levels recommended by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) (USEPA 1990; USEPA 2001).

>>>>TABLE 1 HERE>>>>

Taking into account the findings in soil, exposure to metals was assessed in children using biomarkers such as urinary arsenic and lead in blood (Table 2). The percentage of exposed children (urinary arsenic $> 50 \mu\text{g/g}$ creatinine) was higher in Villa de la Paz; however, regarding mean urinary arsenic a statistical difference was observed only with Matehuala (Table 2). Considering lead in blood concentration (Table 2), children living in Villa de la Paz had higher levels than did the other two communities, and children in Real de Minas had higher concentrations than did the control area of Matehuala; all the differences were significant. Reference levels of 10 $\mu\text{g/dl}$ for blood lead and of 50 $\mu\text{g/g}$ creatinine for urinary arsenic are guidelines set by the United States Centers for Disease Control (CDC 1991; Belson et al. 2005).

>>>>TABLE 2 HERE>>>>

Finally, DNA damage was not different between children living in Villa de la Paz or in Real de Minas, but in these areas it was significantly higher than the damage found in children living in Matehuala (Table 3). It is important to note that baseline DNA damage in the normal population had a tail moment lower than 4.0 (Bajpayee et al. 2002).



>>>>TABLE 3 HERE>>>>

All the above results showed that Villa de la Paz is contaminated with metals and that children living there were the most exposed to arsenic and lead and were among those with a greater DNA damage. However, a clear correlation with soil contamination was not found; thus, we decided to assess the exposure to metals and the same DNA damage effect in rodents, as these animals are heavily exposed to soil. Furthermore, we took advantage of this model, and the concentration of metals were also analyzed in different tissues.

Rodents were collected in the area of Villa de la Paz (exposed area) and in a control area as shown in Figure 1. In the area of Villa de la Paz, arsenic, lead, cadmium, copper and zinc levels in soil, were higher and statistically different ($p < 0.05$) when compared to the levels at the control area (Table 4). Furthermore, concentrations of lead, arsenic and cadmium found in kidney and liver in rodents collected in Villa de la Paz (exposed animals) were significantly higher than those in rodents collected in the control area (Figure 2). With regard to DNA damage, this was also higher in rodents from Villa de la Paz ($p < 0.001$) (Figure 3).

>>>>TABLE 4 HERE>>>>

>>>>FIGURE 2 HERE>>>>

>>>>FIGURE 3 HERE>>>>

DISCUSSION

In this work we have shown that stronger conclusions can be obtained in the assessment of contaminated sites by studying humans and local fauna simultaneously. In Villa de la Paz, a heavily polluted mining site (as shown by the soil concentrations of arsenic, lead, cadmium, copper and zinc), an increased exposure to metals and an increased DNA damage was observed in both children and rodents, as compared to control areas.

The results in children are similar to previous studies of our group, in which we have found a direct correlation between DNA damage and urinary arsenic (Yáñez et al. 2003). Furthermore, three studies have been published recently describing arsenic-induced DNA



damage, either in vitro (Gómez et al. 2005) or in humans (Basu et al. 2005; Palus et al. 2005). Taking into account these antecedents, it is important to note that although environmental levels (metal concentrations in soil) were different between Villa de la Paz and Real de Minas, the risk scenario was similar in these areas (urinary arsenic and tail moment in children were not statistically different in these communities and both were above the control area of Matehuala).

With regard to the results obtained in rodents, our results using the comet assay are comparable to previous reported findings in rodents captured in mining areas (Erry et al. 2000; Milton et al. 2003). However, our study differed from those previous reports in that we also determined metal concentrations both in tissues and in environmental samples (soil). Therefore, we were able to show a correlation with increased DNA damage in the most exposed animals.

Although arsenic-induced genotoxicity has been reported, it is important to take into account that other genotoxic metals were found at high concentrations in surface soil in the area of Villa de la Paz, such as lead (Valverde et al. 2002); cadmium (Valverde et al. 2000; Devi et al. 2001); copper (Banu et al. 2001), and zinc (Banu et al. 2004). Therefore, more studies are needed in order to identify the toxicant(s) involved in the damage of DNA observed in children and rodents. For example, whereas the genotoxic species for copper and zinc are sulfates, in Villa de la Paz we found increased levels of oxides.

Results in children and rodents indicate a common pathway, that is, soil ingestion. For children, soil ingestion is one of the most important pathways of exposure (USEPA, 2002); whereas for rodents, soil/dust ingestion can be an accidental pathway, as the particles may be present on food items. Thus, considering that the objective of risk assessment is to support decision-making by determining risks of adverse effects in human and ecological receivers, the best risk reduction program in Villa de la Paz would be soil remediation.

Remediation programs in developing countries are difficult to establish due to social and economic limitations. Thus, justifications in terms of public health issues and/or



preservation of natural resources (including biota protection) are the conclusions needed in any assessment of a polluted site. In this context, uncertainties have to be reduced as much as possible. Therefore, an integrated approach can be an interesting tool for developing countries. In the case of Villa de la Paz, the data in children and rodents, strengthened the weight of evidence about the health risks (in this case DNA damage) associated with exposure to contaminated soil. A remediation program was thereby easier to justify, and a feasibility study at this site is under way.

Acknowledgement. This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondos Mixtos-SLP) and the National Institute of Ecology, SEMARNAT. We also thank Dr. A. Leyva for English language editing of the manuscript.



REFERENCES

- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2004. Interaction Profile for Arsenic, Cadmium, Chromium and Lead., Atlanta, Georgia, United States.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005a. Toxicological Profile for Arsenic., Atlanta, Georgia, United States.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005b. Toxicological Profile for Lead., Atlanta, Georgia, United States.
- Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Pandey AK, Mathur N, Seth PK. 2002. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mut Res* 520:83-91.
- Banu BS, Devi KD, Mahboob M, Jamil K. 2001. In vivo genotoxic effect of zinc sulfate in mouse peripheral blood leukocytes using Comet assay. *Drug Chem Toxicol* 24(1):63-73.
- Banu BS, Ishaq M, Danadevi K, Padmavathi P, Ahuja YR. 2004. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food Chem Toxicol* 42(12):1931-6.
- Basu A, Som A, Ghoshal S, Mondal L, Chaubey RC, Bhilwade HN, Rahman MM, Giri AK. 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicol Lett* 159:100-112.
- Belson MG, Schier JG, Patel MM. 2005. Case definitions for chemical poisoning. *MMWR* 54:1-24.
- Brown B. 1982. Creatinine measurement Module Operating and Service Instructions, Beckman. Brea (CA): Beckman Instruments, Inc. 54 p.
- Calderón J, Navarro ME, Jiménez-Capdeville ME, Santos-Díaz MA, Golden A, Rodríguez-Leyva I, Borja-Aburto VH, Díaz-Barriga F. 2001. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res* 85:69-76.
- Carrizales L, Razo I, Tellez-Hernández JI, Torres-Nerio R, Torres A, Batres LE, Cubillas AC, Díaz-Barriga F. 2006. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosí, México: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environmental Research* 101(1):1-10.
- CDC. Centers for Disease Control. 1991. Preventing lead poisoning in young children. US Department of Health and Human Services, Atlanta, United States of America.



- CONAPO. 2000. Índices de marginación. Consejo Nacional de Población. Secretaría de Gobernación, México.
- Counter SA, Vahter M, Laurell G, Buchanan LH, Ortega F, Skerfving S. 1997. High lead exposure and auditory sensory-neural function in Andean children. *Environ Health Perspect* 105:522-526.
- Cox DH. 1980. Arsine evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water. *J Anal Toxicol* 4:207-211.
- Da Silva J, de Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics Mol Biol* 23:241-245.
- Devi KD, Banu BS, Mahboob M, Jamil K, Grover P. 2001. In vivo genotoxic effect of cadmium chloride in mice leukocytes using comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 21(5):325-33.
- Díaz-Barriga F, Santos MA, Mejía JJ, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Vera E, Del Razo LM, Cebrian ME. 1993. Arsenic and cadmium absorption in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, Mexico. *Environ Res* 62:242-250.
- Díaz-Barriga F, Batres L, Calderón J, Lugo A, Galvao L, Lara I, Rizo P, Arroyave ME, McConnell R. 1997. The El Paso smelter twenty years later: residual impact on Mexican children. *Environ Res* 74:11-16.
- Erry BV, Macnair MR, Meharg AA, Shore RF. 2000. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Environ Pollution* 110:179-187.
- Festa F, Cristaldi M, Ieradi LA, Moreno S, Cozzi R. 2003. The comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Donana National Park. *Environ Res* 91:54-61.
- Fisher BE. 1998. Between a rock and a healthy place. *Environ. Health Perspect* 106:A544-A546.
- Gómez SE, del Razo LM, Muñoz-Sánchez JL. 2005. Induction of DNA damage by free radicals generated either by organic or inorganic arsenic (AsIII, MMAIII, and DMAIII) in cultures of B and T lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 108:115-126.



- Husby MP, Hausbeck JS, McBee K. 1999. Chromosomal aberrancy in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) collected on abandoned coal strip mines, Oklahoma, USA. *Environ Toxicol Chem* 18:919-925.
- Hwang YH, Bornschein RL, Grote J, Menrath W, Roda S. 1997. Environmental arsenic exposure of children around a former copper smelter site. *Environ Res* 72:72-81.
- IPCS. International Program of Chemical Safety. Integrated Risk Assessment. 2001. Report prepared for the WHO/UNEP/ILO International Programme on Chemical Safety. WHO/IPCS/IRA/01/12.
- Joyce S. 1998. Major issues in miner health. *Environ. Health Perspect* 106:A538-A543.
- Milton A, Cooke JA, Johnson MS. 2003. Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Arch Environ Contam Toxicol* 44:405-411.
- Murgueytio AM, Evans RG, Sterling DA, Clardy SA, Shadel BN, Clements BW. 1998. Relationship between lead mining and blood lead levels in children. *Arch Environ Health* 53:414-423.
- Palus J, Lewinska D, Dziubaltowska E, Stepnik M, Beck J, Rydzynski K, Nilsson R. 2005. DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environ Mol Mutagen* 46:81-87.
- Razo I, Carrizales L, Castro J, Díaz-Barriga F, Monroy M. 2004. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution* 152:129-152.
- Rodríguez VM, Dufour L, Carrizales L, Díaz-Barriga F, Jimenez-Capdeville ME. 1998. Effects of oral exposure to a mining waste on in vivo dopamine release from rat striatum. *Environ Health Perspect* 106:487-491.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Subramanian KS. 1987. Determination of lead in blood: comparison of two GFAAS methods. *At Spectrosc* 8:7-14.
- STATISTICA. 1993. StatSoft, Tulsa, USA.
- Talmage SS, Walton BT. 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev Environ Contam Toxicol* 119:47-145.



- UNEP. Challenges and perspectives” (United Nations Environment Programme, Ed.).
2000a. Mining-facts, figures and environment. In: “Mining and sustainable development II. *Industry and Environ* 23:4-8.
- UNEP. Challenges and perspectives” (United Nations Environment Programme, Ed.).
2000b. Small-scale and artisanal mining. In: “Mining and sustainable development II. *Industry and Environ* 23:49.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1990. Record of Decision (ROD)
Abstract ROD Number: EPA/ROD/R08-90/028 ROD Date: 03/30/90 Site:
WHITEWOOD CREEK. EPA ID Number: SDD980717136. Location: WHITEWOOD,
SD. Operable Unit: 01 Environmental Protection Agency. United States.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2001. Residential Lead Hazard
Standards-TSCA Section 403. Office of Pollution Prevention and Toxics. United States
Environmental Protection Agency. Federal Register, January 5.
www.epa.gov/lead/leadhaz.htm
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2002. Child-specific exposure
factors handbook. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC:
EPA/600/P-00/002B. Available from: National Information Service, Springfield, VA:
PB2003-101678.
- Valverde M, Fortoul TI, Díaz-Barriga F, Mejía J, Rojas CE. 2000. Induction of genotoxicity
by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis* 15(2):109-
114.
- Valverde M, Fortoul TI, Díaz-Barriga F, Mejía J, Rojas CE. 2002. Genotoxicity induced in
CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis* 17(1):55-61.
- Yáñez L, García-Nieto E, Rojas E, Carrizales L, Mejía J, Calderón J, Razo I, Díaz- Barriga
F. 2003. DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a
mining area. *Environmental Research* 93:231-240.



Table 1. Concentrations of arsenic, lead, cadmium, copper and zinc in surface soil in areas where children were sampled (mg/kg).

	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	%>100 mg/kg
Arsenic	Villa de la Paz	42	1932	759	133	27945	100
	Real de Minas ^a	14	709	215	144	3073	100
	Matehuala ^a	41	437	364	40	9822	83
	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	%>400 mg/kg
Lead	Villa de la Paz	42	932	507	45	16800	74
	Real de Minas ^a	14	261	231	135	3450	14
	Matehuala ^{a,b}	41	400	86	63	2214	56
	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	
Cadmium	Villa de la Paz	42	28.4	4.4	4.0	125.4	
	Real de Minas ^a	14	7.4	0.9	5.0	16.0	
	Matehuala ^a	41	12.2	2.6	0.2	68.0	
	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	
Copper	Villa de la Paz	42	826	375	107	10920	
	Real de Minas ^a	14	268	100	87	1288	
	Matehuala ^a	41	296	87	50	3264	
	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	
Zinc	Villa de la Paz	42	1565	254	236	6080	
	Real de Minas ^a	14	344	40	230	760	
	Matehuala ^a	41	438	124	103	3180	

(G mean) geometric mean. (SE) standard error. (a) Different from Villa de la Paz (p<0.05). (b) Different from Real de Minas (p<0.05).



Table 2. Urinary arsenic ($\mu\text{g/g}$) and lead in blood ($\mu\text{g/dl}$) concentrations in children.

	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	%>50 $\mu\text{g/gc}$
Arsenic	Villa de la Paz	20	52.1	7.5	21.4	129	55
	Real de Minas	28	39.5	6.1	13.2	166	30
	Matehuala ^a	12	16.8	1.6	10.8	26	0
	Zone	N	G mean	SE	Min.	Max.	%>10 $\mu\text{g/dl}$
Lead	Villa de la Paz	20	13.8	1.0	5.1	23.5	95
	Real de Minas ^a	28	9.9	0.7	3.7	20.8	50
	Matehuala ^{a,b}	12	7.3	1.5	1.8	22.2	25

(G mean) geometric mean. (SE) standard error. For urinary arsenic ($\mu\text{g/g}$) micrograms of arsenic per gram of creatinine. (a) Different from Villa de la Paz ($p<0.05$). (b) Different from Real de Minas ($p<0.05$).



Table 3. Tail moment in comet cells of children.

Zone	n	G mean	SE	Min.	Max.	%> 4
Villa de la Paz	20	4.8	0.3	2.6	8.9	75
Real de Minas	28	5.4	0.2	3.0	8.0	89
Matchuala^a	12	3.9	0.2	3.1	5.9	42

DNA damage was measured using the comet assay as described in Methods. (G mean) geometric mean. (SE) standard error. (%>4) percentage of children with a tail moment higher than four. (a) Different from Villa de la Paz ($p < 0.05$).



Table 4.- Metal levels in surface soil at sites where rodents were collected (mg/kg).

Metal	Zone	n	G mean	SE	Min.	Max.
Arsenic	Villa de la Paz	15	6230.7	1099.9	813.5	16450.0
	Control^a	15	21.7	1.3	19.1	37.5
Lead	Villa de la Paz	15	1192.3	70.1	528.0	1704.0
	Control^a	15	23.8	1.2	16.0	30.4
Cadmium	Villa de la Paz	42	28.4	4.4	4.0	125.4
	Control^a	3	0.8	0.1	0.7	0.9
Copper	Villa de la Paz	15	703.7	226.3	297.5	1047.5
	Control^a	15	25.6	1.6	23.8	28.8
Zinc	Villa de la Paz	15	3513.5	1501.1	617.5	6025.0
	Control^a	15	87.3	43.9	58.8	192.5

(G mean) geometric mean. (SE) standard error. (a) Different from Villa de la Paz (p<0.05).



Figure Legends:

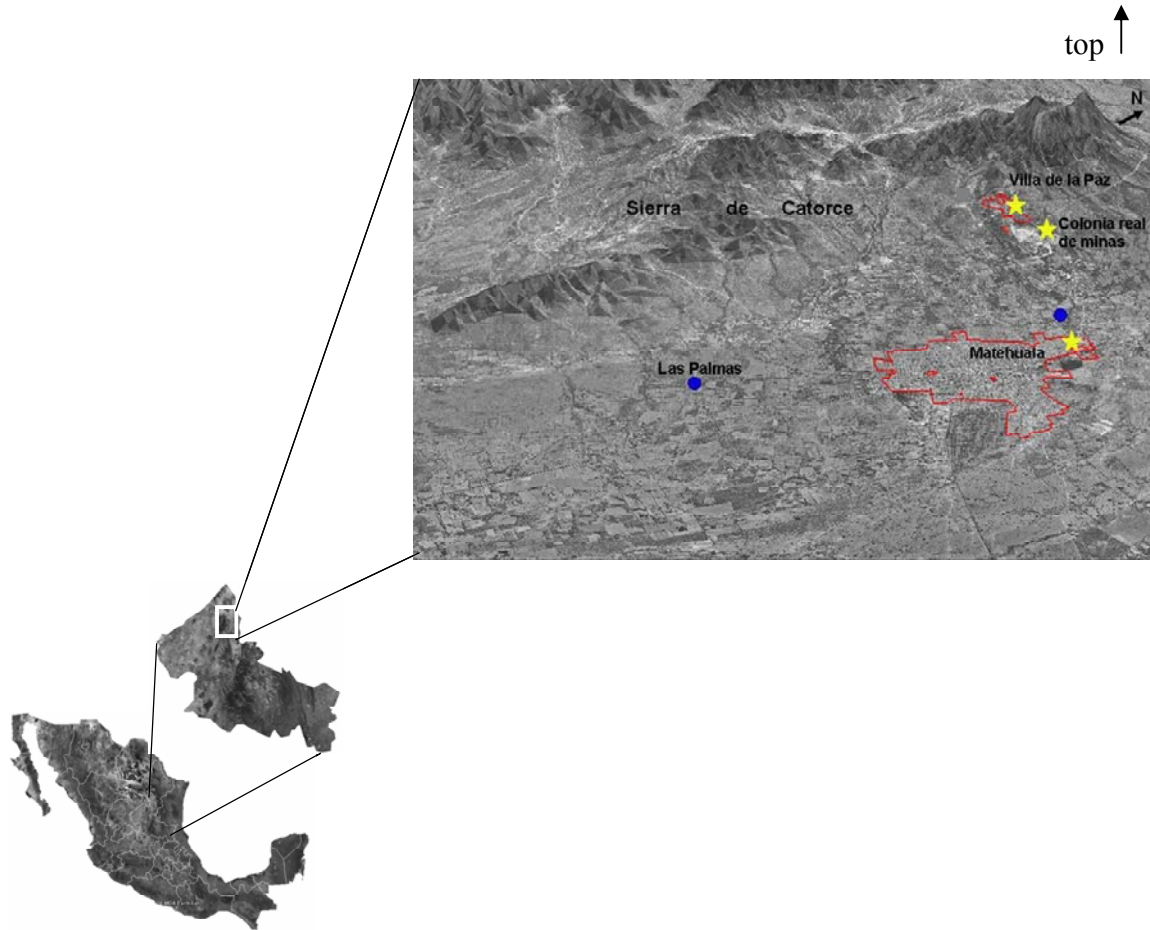
Figure 1. On the map are shown the sampling sites for children (stars) and rodents (circles).

Figure 2. Concentration of lead, arsenic and cadmium ($\mu\text{g/g}$ wet tissue) in liver and kidney of rodents. Control site (Matehuala), exposed site (Villa de La Paz).

Figure 3. Olive tail moments in blood cells from rodents collected in the control and exposed areas ($p < 0.001$).

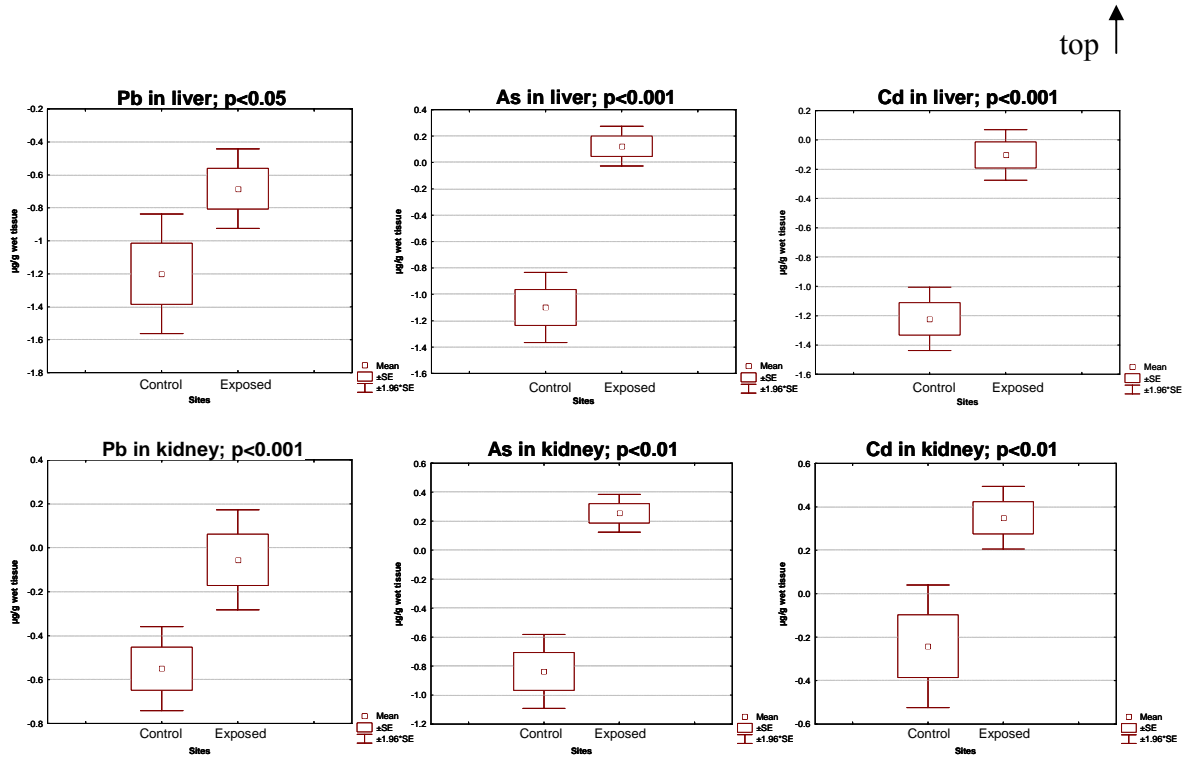


Jasso-Pineda *et al.*, 2006, Figure 1



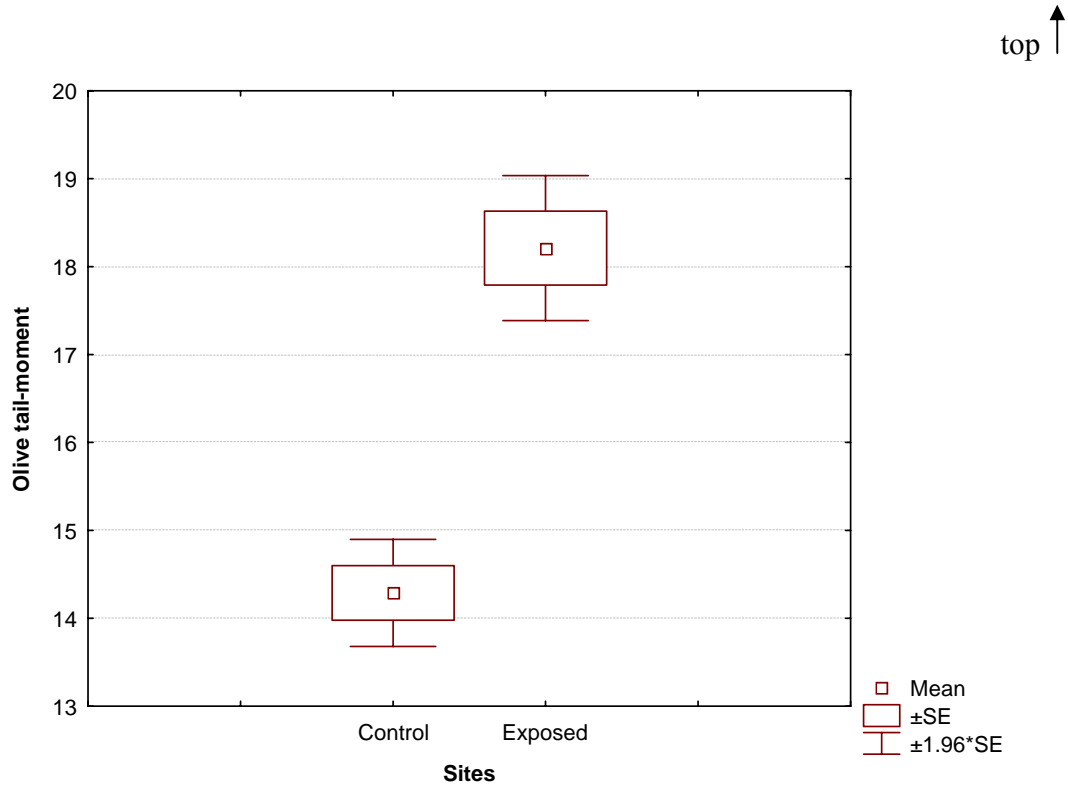


Jasso-Pineda *et al.*, 2006, Figure 2





Jasso-Pineda *et al.*, 2006, Figure 3





TERCER ARTÍCULO.- Wild Rodents (*Dipodomys merriami*) like Biomonitor in Contaminated Mining Sites

Artículo enviado a la revista. *Journal of Environmental Science and Health A*. [En
revisión]



Wild Rodents (*Dipodomys merriami*) Can Be Used as Biomonitors in Contaminated Mining Sites.

Guillermo Espinosa-Reyes¹, Arturo Torres-Dosal², Cesar Ilizaliturri¹, Donaji González-Mille¹, Fernando Díaz-Barriga¹ and Jesús Mejía-Saavedra^{1*}

¹Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. CP 78210

²El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Carretera Villahermosa/Reforma Km 15.5 Ranchería Guineo 2a. Sección. Villahermosa, Tabasco, México. CP 86280.

*Address correspondence to: José de Jesús Mejía-Saavedra, Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Avenida Venustiano Carranza 2405, Col. Lomas Los Filtros, CP 78210, San Luis Potosí, SLP, México. Phone and fax: (52-444) 826-2354; E-mail: jjesus@uaslp.mx



ABSTRACT

Mining is one of the most important industrial activities globally. However, mining processes are considered activities of significant environmental impact. Heavy metals may have impacts on the health of exposed human populations and nonhuman receptors. This study focused on Arsenic because its genotoxicity is well-known. Previously we proposed a way to evaluate integrate risk from a single source affecting different biologic receptors. Here we propose an alternative approach estimating arsenic exposure in children and kangaroo rats using probabilistic simulation with Monte Carlo modeling. The estimates are then associated to measured DNA damage and compared to both populations of children and rodents living in contaminated and in reference areas. Finally, based on the integrated analysis of generated information, we evaluate the potential use of wild rodents (*Dipodomys merriami*) as a biomonitor at mining sites. Results indicate that the variation of genotoxicity in children of the reference site is ≈ 2 units when compared to the children of the contaminated site; in the rodents we observed a variation of ≈ 4 units between those of the reference site when compared to those living on the contaminated site. We hypothesized that *D. merriami* could be used as a biomonitor organism in sites with mining activity, and that a non-lethal test can be used to evaluate risk from metal exposure.

Key words: *Dipodomys merriami*, Biomonitor, Children, Arsenic, Monte Carlo



INTRODUCTION

Mining is one of the most important industrial activities globally. It is estimated that there are at least 10,000 mining industries and more than 20,000 mining sites, processing plants and smelters. ^[1] Globally, Mexico is a major producer of metals (Ag, As, Au, Cu, Pb, Sn, Zn), and thus mining is an important economic activity. ^[2, 3, 4] However, mining processes are considered an activity of significant environmental impact because they are major sources of metals and metalloids that contribute significantly to the pollution of soil, sediment, water and air. ^[1, 5, 6]

Heavy metals may have impacts to the health of exposed human populations. ^[7] However, in many scenarios, environmental contamination could have more pronounced effects on nonhuman receptors because these organisms may be more sensitive or are more highly exposed. ^[8, 9] For this reason, highly exposed non-human receptors may be used as sentinel organisms or biomonitors in mining areas. ^[10, 11] Van der Schalie et al. ^[12] explain some potential applications identified for sentinel species in environmental monitoring. The biomonitors are able to accumulate contaminants in their tissues without significant adverse effects, which can be studied over time. The data obtained could be useful for a weighted evidence approach in risk assessment decisions, for providing early warning of situations requiring further study, or for suggesting potential causes and effects. Previously, pocket gophers, *Thomomys talpoides*; ^[13] geckos, *Tarentola mauritanica*; ^[14] terrestrial snails *Helix aspersa*; ^[15] and many terrestrial vertebrate species have been used to indicate contamination by metals and arsenic in different sites. ^[16]



A biomonitor is a species which shares its environment with humans. Generally, their food and water sources are similar to humans. Rodents are an excellent subject in which biological experiments are performed with different pollutants, as they often respond to exposure to toxic substances in a manner similar to humans. Also, the effects of such pollutants are often manifested in animals earlier than in humans.

In a previous study, our group performed an integrated risk assessment in which children and native rodents were studied in the mining site of Villa de la Paz, SLP, Mexico and a nearby reference area.^[17] We showed that children in Villa de la Paz had higher levels of arsenic in their urine. In rodents, it was found that concentrations of arsenic in tissue (liver and kidney) were higher in individuals in Villa de la Paz than they were at the reference site. Also, DNA damage was assessed through the comet assay method in children and rodents. The results recorded for both cases (children and rodents) showed higher DNA damage in populations living in Villa de la Paz than at the reference site.

This paper focuses on the metalloid arsenic (As) because there are many studies demonstrating high levels of arsenic in urine of children in Villa de la Paz^[18-23] and in tissues (liver and kidney) of wild rodents.^[13, 17, 24-30] Furthermore, one of the most important effects of arsenic is DNA damage in humans^[22, 31-33] and small mammals.^[13, 28, 17, 34, 35]

The species *Dipodomys merriami* was chosen as a potential biomonitor due to their high exposure to contaminants in soil and in their food. The kangaroo rat *D. merriami* feeds mainly on seeds of mesquite and creosote bush, among other species of shrubs, and occasionally remains of grasses, weeds and insects have been found in their cheek pouches. Based on the



the type of vegetation in the scrub desert region where the rodents were captured, their main diet should be seeds of shrub species such as mesquite (*Prosopis laevigata*) leatherstem (*Jatropha dioica*), creosote bush (*Larrea tridentata*) shrub blue sage (*Salvia ballotaeflora*), and cane cholla (*Opuntia imbricata*).^[36, 37] The average territory size for males of the species is 67,300 square feet, less than one acre. Average female territories are 4,000 square feet.^[38]

It was decided to perform the study with human children because they are more sensitive than adults. Landrigan^[39] mentions that children have unique patterns of environmental exposure and are more susceptible to toxins in the environment compared to adults. Because of physiological and behavioral differences, exposures among children are expected to be different from exposures among adults. Children may be more exposed to some environmental contaminants, because they consume more of certain foods and water per unit of body weight and have a higher ratio of body surface area to volume than adults.

In the current study we propose an alternative way to integrate risk from a single source affecting different biologic receptors; we estimated the arsenic exposure dosage in children and kangaroo rats from soil, using probabilistic simulation by Monte Carlo modeling to characterize variability using Crystal Ball.

Monte Carlo analysis was conducted in the following manner: a) information was assigned about the probability distribution of each input parameter and variable in the system; b) for every calculation, the simulation used a value for each input parameter randomly selected by the Monte Carlo engine from the probability density function for that specific variable. In making multiple calculations, the Monte Carlo engine produced a range of values for the input parameters and variables, reflecting the probability density function of each input parameter



and variable; c) we entered the set of samples ('shot') into the deterministic model previously generated; and finally, d) the model results were stored and the process was repeated until the specified number of model iterations was completed.

The exposure estimates were then associated to measured DNA damage and compared in both populations of children and rodents living in contaminated and in reference areas. Finally, based on the integrated analysis of generated information, we evaluated the potential use of wild rodents (*Dipodomys merriami*) as a biomonitor at mining sites.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

The mineral deposit in Villa de La Paz in San Luis Potosi, Mexico is type *skarn* of Pb-Zn-Ag (Cu-Au), and has been mined over the last 200 years (Figure 1). Soil studies have reported high concentrations of arsenic. ^[40]

<<< FIGURE 1 HERE >>>

Capture of Rodents



Eighty Sherman traps for live capture were used during two consecutive nights. Forty traps were placed in a grid of 1350 m² in each site (contaminated and reference). The contaminated site is located at 23° 40' 26.1" N and 100° 39' 39.7" W and the reference site is located at 23° 33' 47.6" N and 100° 41' 14.2" W. Both sites are dominated by desert scrub vegetation. The climate is typically dry moderated by rains in summer. ^[41] Various species were captured. However, the current study focuses on kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) because they are the most abundant species in both areas. Nine animals were captured at the contaminated site and eight animals were captured in the reference area. The exact age of the captured rodents was not determined, however, the specimens were classified into three groups according to their size and morphological characteristics: a) juveniles, b) sub-adults and c) adults. The study was only performed on adult specimens (> 1 year).

Arsenic Quantification

Arsenic in soil was analyzed by atomic absorption spectrometry using a Perkin Elmer Analyst 100 atomic absorption spectrometer coupled with a Perkin Elmer FIAS 100 hydride generation system.

Comet Assay

In children, single cell gel electrophoresis (comet assay) was performed as described by Singh et al. ^[42] For rodents, we used the same method, the only modification to this protocol



consisted in the use of 20 μL instead of 15 μL recommended by Singh. The comet assay method are described in detail by Jasso et al. ^[17]

Probabilistic Estimation of Oral Exposure of *Dipodomys merriami* (kangaroo rats) and Children -Contaminated Soil Arsenic-

Contaminant exposure estimates are frequently generated using conservative and deterministic parameter values (e.g., contaminant concentration in soil, food, water, or air; ingestion rates; or diet composition) in the exposure model. Employing deterministic estimates for the input parameters in the exposure model does not take into account the variation associated with the parameters. Calculation of the exposure model using point estimates produces a point estimate of exposure. This single value provides no information concerning the distribution of exposures or the likelihood that individuals within an area had potentially hazardous exposures. To incorporate variation in exposure input parameters and to provide a better estimate of the potential exposure experienced by our specific receptor (human and kangaroo rats), exposure modeling was performed using probabilistic methods such as Monte Carlo simulation.

Oral daily dose exposure to arsenic in both receptors human and *Dipodomys merriami* from Villa de la Paz were calculated using the following equation:

$$ED = \frac{C_{\text{soil}} \times IR \times B}{BW \times Cf}$$



Where ED represents the exposure dosage (mg/kg day); C_{soil} is the concentration of As in the soil (mg/kg); IR is the dosage ingested daily (Kg/day); B is the bioavailability (%) and Cf is the correction factor $=1 \times 10^{-6}$ (unitless). This equation was obtained thro the Panamerican Health Organization. ^[43] The distribution and values of the parameters used in the analysis of the exposure are presented in Table 1. The majority of the parameters were obtained from previous studies of our group and some were obtained from literature. The distributions of the parameters obtained through sampling were adjusted to the empirical data using Crystal Ball software, v7.3.1. 2005 (Desisioneering, Denver, CO, USA). Details of the variables entered are presented below.

The concentrations of arsenic in the soil for the sample sites of children and rodents were obtained through site sampling. In this scenario, accidental ingestion of soil is a common route of exposure to arsenic for children and rodents. Children are commonly exposed by playing in contaminated areas, and hand to mouth activities. *Dipodomys merriami* conduct the majority of their biologic activities in burrows. Previous studies indicated that neither food nor water represents an important source of metal exposure to wild biota or humans. ^[16, 44] Although some reports from the region indicate high levels of arsenic in the water (420 μL) it is not considered an important route of delivery to the receptors because the majority of the water consumed in the locality is bottled. In the case of *Dipodomys merriami* water is obtained directly through metabolic processes or in few cases the ingestion of water. ^[45] The weight of children and rodents was obtained onsite. Ratios for the quantity ingested by both receptors was obtained from the literature ^[37, 46] The bioavailability for the human receptors was determined through the Physiologically Based Extraction Test (PBET) method which establishes conditions similar to the human digestive process. ^[44] The value considered for this study corresponds to the highest reported for the region. The bioavailability for rodents was



estimated with body weight, the amount of food ingested, and the amount of soil ingested. 2% of the complete soil intake is considered to be bioavailable, assuming a scenario of greatest risk.

<<< TABLE 1 HERE >>>

Statistical Analysis

The comparison of the estimated doses of arsenic intake in children and rodents was performed by the t-test for independent groups. The level of statistical significance was $p < 0.05$. All analyses were conducted using STATISTICA version 8.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Van der Schalie et al. ^[12] recommends using biomarkers of exposure and effect that as much reflect similar biological events in humans as in the sentinel species or biomonitor. Previously, Razo et al. ^[40] and Jasso et al. ^[17] showed that there was a significant difference in soil arsenic concentration between reference and contaminated areas. We estimated oral exposure to arsenic by soil ingestion in human and rodents in reference and contaminated areas. Table 2 indicates that there was a significant difference ($p < 0.001$) between oral dose exposure in the reference and contaminated areas.

<<< TABLE 2 HERE >>>



Figure 2 compares exposure media value of estimated dose of arsenic from soil to measured DNA damage in children and rodents at the reference and contaminated areas ($p < 0.05$; $p < 0.001$, respectively). The DNA damage in rodents was higher than in children.

According to Figure 2, rodents can be used as biomonitors and the evidence generated suggests that *D. merriami* is more sensitive than the children. The difference in As exposure of the children from the reference site compared to those of the contaminated site varies by 2 orders of magnitude. A similar pattern appears with the rodents. The effect (genotoxicity) in children of the reference site is smaller ≈ 2 units as compared to the children of the contaminated site. In the rodents a variation of ≈ 4 units is observed between the rodents of the reference site as compared to those of the contaminated site. The difference in orders of magnitude suggests more sensitivity in the rodents, since their DNA damage was greater than that of the children with the same proportion of exposure doses.

<<< FIGURE 2 HERE >>>

Results in children and rodents could indicate a common pathway (i.e., soil ingestion) of exposure. For children, soil ingestion is one of the most important pathways of exposure.^[47] For rodents, soil/dust ingestion can be an accidental pathway, because the particles may be present on food items.

Despite the low availability of water and extreme climate, this region has traditionally produced corn and beans for subsistence. In the statistical yearbook of the state of San Luis Potosí^[48] in the municipality of Villa de la Paz, there are no records of fertilized agricultural areas, making it unlikely that pesticides are present in the region.



The characteristics and life history traits of small mammal species such as *Dipodomys merriami* help define their utilization as a biomonitor of arsenic soil contamination because they are present over a wide geographic distribution, have small home ranges,^[38] and as a burrowing species have a high potential for exposure (soil and dust ingestion). Studies about the effects of metals to kangaroo rats are available.^[17] The rats are also relatively easy to collect. Kangaroo rats are widely distributed in semiarid and arid regions of North America. Their biology is well studied, and they are readily found on sandy or soft soils which allow them to make their burrows.

CONCLUSIONS

This work showed a method of risk integration in addition to those we have previously reported in Jasso et al.^[17] The goal of this paper is to suggest an alternative process of human and ecological risk assessment using probabilistic modeling in order to estimate dosage exposure instead of using lethal animal sampling to quantify tissue contaminant concentration. This approach combined a) calculated dosage (mg of As taken from soil / kg of receptor body weight daily) and b) measured adverse effect -DNA damage- using comet assay and expressed as tail moment.

Our previous studies showed that neither food nor water represents an important source of metal exposure to wild biota or human populations (data not showed), however, in this scenario, accidental ingestion of soil is a common route of exposure to arsenic for children and rodents. Children are commonly exposed by playing in contaminated areas, and through hand



to mouth activities; furthermore *Dipodomys merriami* conduct the majority of their biologic activities in burrows. Thus, they are more exposed than children. Kangaroo rats may be a good biomonitor for detecting early effects (e.g. genotoxicity) and alerting potential future effects to humans.

In arid and semi-arid areas of northern Mexico and southern United States there are some mine sites like Villa de la Paz. Coupled with the wide distribution of kangaroo rats which coincides with several mine sites of North America and based on the life habits and small home range, we postulated that *Dipodomys merriami* could be used as a biomonitor organism in sites with mining activity using a non-lethal test to evaluate risk from metal exposure. Finally, the sensitivity of *D. merriami* as a biomarker can be used in exposure to metals, in a biomonitoring program in the region that could estimate possible effects to the juvenile population.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the National Institute of Ecology, SEMARNAT (2004-01-9-0238) and the Universidad Autónoma de San Luis Potosí (C07-FAI-11-2.38). We would also like to thank Dr. DRJ Moore for commenting on the manuscript. We also thank Biol. Susan Quackenbush for English language editing of the manuscript. This study was conducted with a Scientific Collector's Permit (Colector Científico de Flora y Fauna Silvestre) issued through SEMARNAT (No. FAUT-0133). The studies involving humans were conducted in accordance with national and institutional health guidelines for the protection of human subjects.



REFERENCES

1. UNEP. *Mining and sustainable development II: challenges and perspectives*. United Nations Environment Programme Division of Technology, Industry and Economics. 2000, 96.
2. SE. *Informe de la minería mexicana*. Secretaría de Economía. México. D.F. 2004, 51.
3. INEGI. Producción minerometalúrgica en México. <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=ind01&c=1061> (accessed May 2008).
4. SGM. *Anuario estadístico de la minería mexicana ampliada*. Servicio Geológico Mexicano y Secretaría de Economía. México, D.F. 2007, 481.
5. Nriagu, J.O.; Pacyna, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*. **1988**, 333, 134-139.
6. Madhavan, N.; Subramanian, V. Sulphide mining as a source of arsenic in the environment. *Current Science*. **2000**, 78, 702-742.
7. ATSDR. *Interaction profile for arsenic, cadmium, chromium and lead*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia, United States. 2004, 181.
8. Suter II, G.W. *Ecological risk assessment*. Lewis Publishers. United States. 1993, 538.



9. Aylward, L.L.; Hays, S.M.; Karch, N.J.; Paustenbach, D.J. Relative susceptibility of animals and humans to the cancer hazard posed by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin using internal measures of dose. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 3534-3543.

10. NIEHS/EPA. *The use of wildlife biomonitoring at hazardous waste sites*. National Institute of Environmental Health Sciences/Environmental Protection Agency. Superfund Basic Research Program "Research Brief" (Number 19). 1998. Available in: <http://www.tieh.ttu.edu/mhooper/rocky.htm> (accessed Jun 2008).

11. Fox, G.A. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes–St. Lawrence Basin. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*(6), 853-861.

12. Van der Schalie, W.H.; Gardner, H.S. Jr.; Bantle, J.A.; De Rosa, C.T.; Finch, R.A.; Reif, J.S.; Reuter, R.H.; Backer, L.C.; Burger, J.; Folmar, L.C.; Stokes, W.S. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107*(4), 309-315.

13. Reynolds, K.D.; Schwarz, M.S.; McFarland, C.A.; McBride, T.; Adair, B.; Strauss, R.E.; Cobb, G.P.; Hooper, M.J.; McMurry, S. Northern pocket gophers (*Thomomys talpoides*) as biomonitors of environmental metal contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 458-469.



14. Fletcher, D.E.; Hopkins, W.A.; Saldaña, T.; Baionno, J.A.; Arribas, C.; Standora, M.; Fernández-Delgado, C. Geckos as indicators of mining pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*(9), 2432-2445.
15. De Vaufleury, A.; Coeurdassier, M.; Pandard, P.; Scheifler, R.; Lovy, C.; Crini, N.; Badot A.P.M. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*(3), 797–806.
16. Golden, N.H.; Rattner, B.A. Ranking terrestrial vertebrate species for utility in biomonitoring and vulnerability to environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *176*, 67–136.
17. Jasso-Pineda, Y.; Espinosa-Reyes, G.; González-Mille, D.; Razo-Soto, I.; Carrizales, L.; Torres-Dosal, A.; Mejía-Saavedra, J.; Monroy M.; Ize, A.I.; Yarto, M.; Díaz-Barriga, F. An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2007**, *3*(3), 344-350.
18. Díaz-Barriga, F.; Santos, M.A.; Mejía, J.J.; Batres, L.; Yáñez, L.; Carrizales, L.; Vera, E.; Del Razo, L.M.; Cebrian, M.E. Arsenic and cadmium absorption in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, Mexico. *Environ Res.* **1993**, *62*, 242-250.
19. Díaz-Barriga, F.; Batres, L.; Calderón, J.; Lugo, A; Galvao, L.; Lara, I.; Rizo, P.; Arroyave, M.E.; McConnell, R. The El Paso smelter twenty years later: residual impact on mexican children. *Environ. Res.* **1997**, *74*, 11-16.



20. Hwang, Y.H.; Bornschein, R.L.; Grote, J.; Menrath, W.; Roda, S. Environmental arsenic exposure of children around a former copper smelter site. *Environ. Res.* **1997**, *72*, 72-81.

21. Murgueytio, A.M.; Evans, R.G.; Sterling, D.A.; Clardy, S.A.; Shadel, B.N.; Clements, B.W. Relationship between lead mining and blood lead levels in children. *Arch. Environ. Health.* **1998**, *53*, 414-423.

22. Yáñez, L.; García-Nieto, E.; Rojas, E.; Carrizales, L.; Mejía, J.J.; Calderón, J.; Razo, I.; Díaz-Barriga, F. DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. *Environ. Res.* **2003**, *93*, 231-240.

23. Carrizales, L.; Razo, I.; Tellez-Hernández, J.I.; Torres-Nerio, R.; Torres, A.; Batres, L.E.; Cubillas, A.C.; Díaz-Barriga, F. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosí, México: importance of soil contamination for exposure of children. *Environ. Res.* **2006**, *101*(1), 1-10.

24. Talmage, S.S.; Walton, B.T. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, *119*, 47-145.

25. Erry, B.V.; Macnair M.R.; Meharg A.A.; Shore R.F. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Environ. Pollut.* **2000**, *110*, 179-187.



26. Torres, K.C.; Johnson, M.L. Bioaccumulation of metals in plants, arthropods, and mice at a seasonal wetland. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2617-2626.

27. Milton, A.; Cooke, J.A.; Johnson, M.S. Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 405-411.

28. Ieradi, L.A.; Zima, J.; Allegra, F.; Kotlánova, E.; Campanella, L.; Grossi, R.; Cristaldi, M. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zool.* **2003**, *52*, 57-66.

29. Sumbera, R.; Barus, V.; Tenora, F. Heavy metals in the silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus* (Bathyergidae, Rodentia) from Malawi. *Folia Zool.* **2003**, *52*, 149-153

30. Swiergosz-Kowalewska, R.; Gramatyka, M.; Reczynsky, W. Metals distribution and interactions in tissues of shrews (*Sorex* spp.) from copper and zinc contaminated areas in Poland. *J. Environ. Qual.* **2005**, *34*, 1519-1529

31. Counter S.A.; Vahter, M.; Laurell, G.; Buchanan, L.H.; Ortega, F.; Skerfving, S. High lead exposure and auditory sensory-neural function in Andean children. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105*, 522-526.



32. Calderón, J.; Navarro, M.E.; Jiménez-Capdeville, M.E.; Santos-Díaz, M.A.; Golden, A.; Rodríguez-Leyva, I.; Borja-Aburto, V.H.; Díaz-Barriga, F. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res.* **2001**, *85*, 69-76.
33. ATSDR. *Toxicological profile for arsenic*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia. United States. 2005, 533.
34. Da Silva, J.; De Freitas, T.; Marinho, J.R.; Speit, G.; Erdtmann, B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.* **2000**, *23*(1), 241-245.
35. Festa, F.; Cristaldi, M.; Ieradi, L.A.; Moreno, S.; Cozzi, R. The comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Donana National Park. *Environ. Res.* **2003**, *91*(1), 54-61.
36. Soholt, L.F. Consumption of primary production by a population of kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) in the Mojave Desert. *Ecol. Monogr.* **1973**, *43* (3), 357-376.
37. Reynolds, H. The ecology of the Merriam kangaroo rat (*Dipodomys merriami* Mearns) on the grazing lands of southern Arizona. *Ecol. Monogr.* **1958**, *28*, 110-127.
38. Zeng, Z.; Brown, J.H. Population ecology of a desert rodent: *Dipodomys merriami* in the Chihuahuan desert. *Ecology.* **1987**, *68* (5), 1328-1340.



39. Landrigan, P.J. Children as a vulnerable population. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, **2005**, *11* (1), 235 – 238.
40. Razo, I.; Carrizales, L.; Castro, J.; Díaz-Barriga, F.; Monroy, M. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water Air Soil Pollut.* **2004**, *152*, 129-152.
41. García, E. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4ª Edición. Offset Larios. México. D. F. 2004, 218.
42. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* **1988**, *175*, 184-191.
43. Díaz-Barriga, F. *Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados*. Organización Panamericana de la Salud. Ops/Cepis/Pub/99.34. Lima, Perú. 1999, 42.
44. Razo, I.; Téllez, J.; Monroy, M.; Carrizales, L.; Díaz-Barriga, F.; Castro, J. As and Pb bioaccessibility in polluted soils from a mining site under semiarid climate in México. *Proceedings of the Tailings and Mine Waste Conference*. Balkema Publishers. Netherlands. **2004**, 173-184.



45. Schmidt-Nielsen, K. *Why is animal size so important?* Cambridge University Press. New York, USA. 1984, 237.

46. EPA. *Wildlife exposure factors handbook*. Vol. I. (U.S. Environmental Protection Agency). EPA/600/R-93/187a. Office of Research and Development, Washington, D.C. 1993, 572.

47. USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Child-specific exposure factors handbook*. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC: EPA/600/P-00/002B. 2002, Available from: National Information Service, Springfield, VA: PB2003-101678.

48. INEGI. Anuario estadístico del estado de San Luis Potosí (2008)
http://www.ctreig.gob.mx/ctreig_dic_211.swf



FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Location of the mining site of Villa de la Paz, San Luis Potosí, Mexico.

Figure 2. DNA damage in children and rodents versus media value of estimated dose of arsenic for children and rodents.

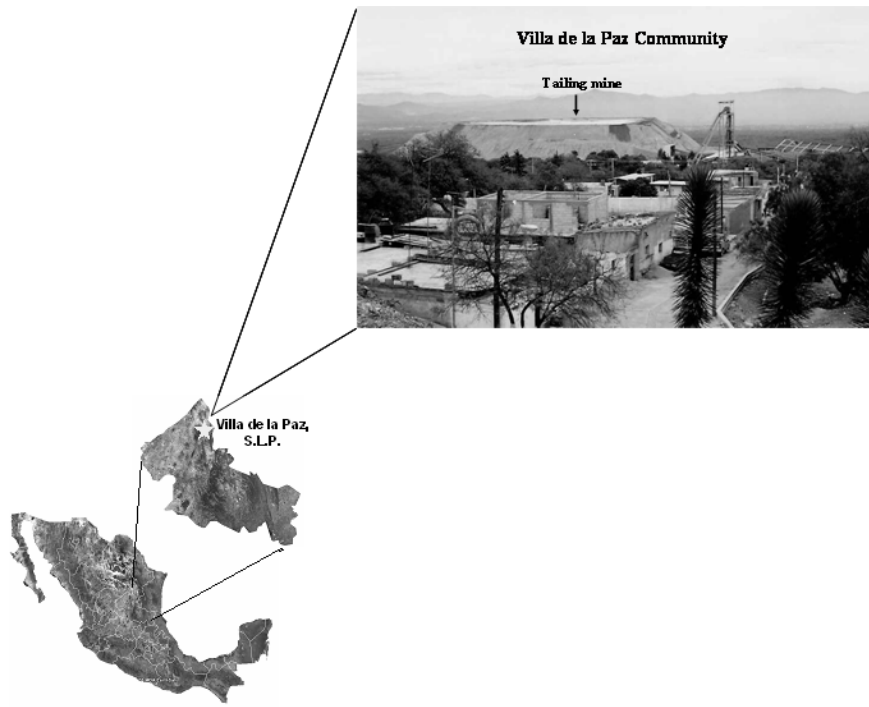


Fig 1

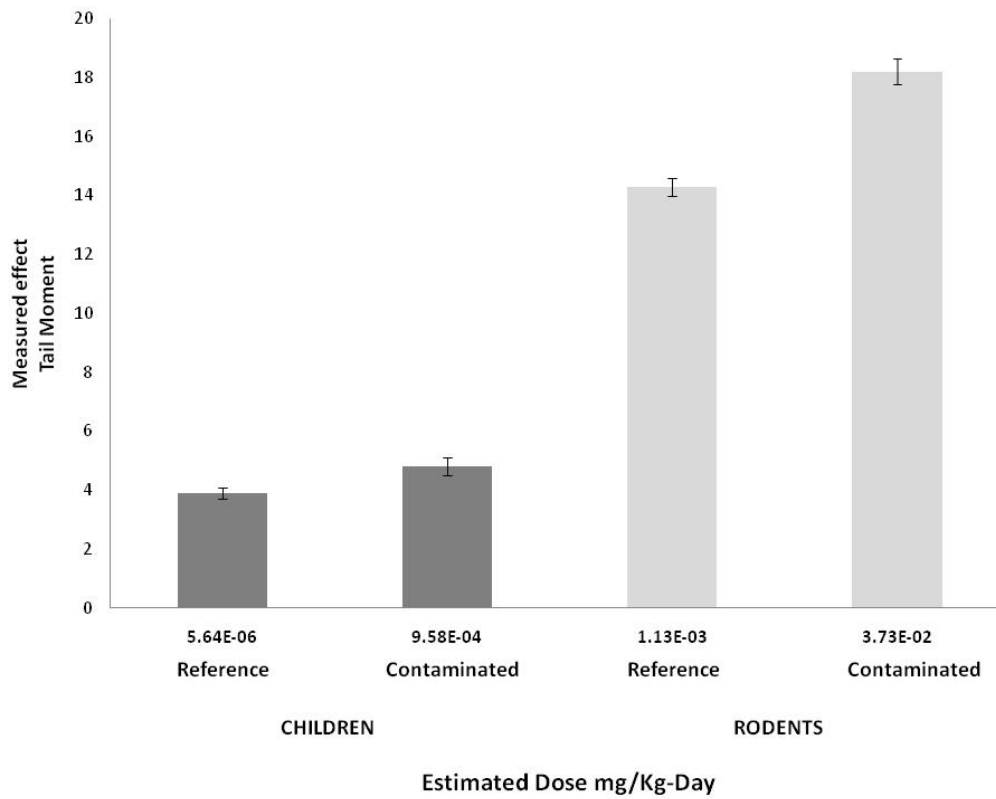


Fig 2



Table 1. Parameters used to estimate oral exposure to As in rodents and children.

Species	Variable	Distribution	Origin of Data	Media	Standard deviation	Note
Kangaroo Rats <i>Dipodomys merriami</i>	As concentration in soil (mg/ kg) Reference area	Log-Normal	Sampling	23.00	4.9	-
	As concentration in soil (mg/ kg) Contaminated area	Log-Normal	Sampling	7902.60	4259.8	-
	Body weight (kg)	Log-Normal	Sampling	0.0421	0.0069	-
	Food intake rate (kg/ day)	Log- Normal	Reynolds, 1958	5.05×10^{-03}	7.32×10^{-04}	12% of body weight
	Soil intake rate (kg/ day)	Log- Normal	EPA, 1993	1.01×10^{-05}	1.46×10^{-05}	2% of food intake
Children	As concentration in soil (mg/ kg) Reference area	Log-Normal	Sampling	17.0	8.0	
	As concentration in soil (mg/ kg) Contaminated area	Log-Normal	Sampling	2721.42	7841.03	
	Body weight (Kg)	Log-Normal	Sampling	25.24	8.82	
	Soil intake rate (kg/ day)	Triangle	Sampling	0.350	-	Minimum Value: 0.200 Maximum Value: 0.400
	Gastric bioaccessibility	Log-Normal	Sampling	0.20	0.23	
	Conversion factor (unit less)	-	-	1.0×10^{-6}	-	-



Table 2. Oral exposure dose estimate of arsenic from soil on children and *Dipodomys merriami*.

Site	Estimated Dose of As Exposure Mean \pm SE (mg/ kg-day)	
	Children	<i>Dipodomys Merriami</i>
Reference	$5.64 \times 10^{-06} \pm 1.2 \times 10^{-07}^\dagger$	$1.13 \times 10^{-03} \pm 1.7 \times 10^{-05}^*$
Contaminated	$9.58 \times 10^{-04} \pm 1.5 \times 10^{-04}$	$3.73 \times 10^{-01} \pm 6.8 \times 10^{-03}$

[†]Indicate significant difference in relation to exposure dose on contaminated area ($p < 0.001$).

^{*}Indicate significant difference in relation to exposure dose on contaminated area ($p < 0.001$).



CUARTO ARTÍCULO.- Effects in the wild rodents community of a mining site in San Luis Potosí, Mexico

Artículo en proceso



Effects in the wild rodents community of a mining site in San Luis Potosí, Mexico

Guillermo Espinosa-Reyes^{†*}, Jesús Mejía-Saavedra[†], Cesar Ilizaliturri Hernández, Donají González-Mille[†], Rogelio Costilla-Salazar[†], Iván Pérez-Maldonado[†] and Fernando Díaz-Barriga[†]

[†]Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. CP 78210

Running head: Ecological Risk Assessment, Heavy Metals and Wild Rodents

“*To whom correspondence may be addressed”: Guillermo Espinosa-Reyes. Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Venustiano Carranza 2405, Col. Lomas Los Filtros, CP 78210, San Luis Potosí, SLP, México. Telephone and Fax: (52-444) 826-2346 Ext. 565. E-mail: pmpca_gespinosa@yahoo.com.mx



RESUMEN

La minería es una de las actividades industriales más importantes a nivel mundial. Sin embargo, es considerada una actividad productiva de alto impacto ambiental. Villa de la Paz es un sitio minero que tiene aproximadamente 200 años de actividad, durante este periodo se ha generado una gran cantidad de residuos, los cuales se han depositado a cielo abierto, por lo que representan un riesgo ambiental. El objetivo fue evaluar las comunidades de roedores silvestres en esta región minera. Se eligieron dos sitios de muestreo (alta exposición y referencia). Estos sitios presentan características bióticas y abióticas similares. Se realizaron cinco salidas al campo para la captura-recaptura de roedores, las salidas se hicieron en diferentes estaciones del año durante el periodo comprendido de Septiembre de 2005 a Marzo de 2007. Los roedores se capturaron con trampas Sherman para captura viva. Durante las cinco salidas se capturaron en total 77 roedores, 43 en el sitio de referencia y 34 en el sitio contaminado. En el sitio de referencia se capturaron seis especies pertenecientes a dos familias; Heteromyidae y Muridae y en el sitio contaminado se capturaron dos especies pertenecientes a la familia Heteromyidae. En ambos sitios *Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni* fueron las especies más abundantes. No se registraron efectos adversos en los niveles individual y poblacional. La diversidad de la comunidad de roedores del sitio de referencia ($H' = 1.28$) es mayor que la del sitio contaminado ($H' = 0.69$). El índice de similitud de Jaccard es de (0.33). La pérdida de diversidad en el sitio de alta exposición es una evidencia contundente del riesgo que existe en la comunidad de roedores de Villa de la Paz, San Luis Potosí.

Palabras clave: Evaluación de Riesgo Ecológico, Metales, Roedores silvestres, Diversidad biológica.



INTRODUCCIÓN

La evaluación de riesgo ecológico es un instrumento que proporciona elementos de juicio adecuados para la toma de decisiones, una vez que se demuestra efecto en algún receptor biológico. El riesgo ecológico es la probabilidad de que se presenten efectos adversos en la biota, ocasionados por sustancias tóxicas derivadas de la actividad humana, sobre los diferentes niveles de organización biológica. En un escenario ecológico la evaluación de riesgo debe considerar las expresiones actuales y futuras de efectos ecológicos adversos en condiciones de campo. En este contexto, los organismos de vida silvestre son el modelo ideal para realizar estudios de exposición y efecto en sitios impactados por compuestos tóxicos.

La minería es una de las actividades industriales más importantes a nivel mundial. Se estima que hay al menos 10,000 industrias mineras y más de 20,000 sitios mineros, plantas de procesamiento y fundidoras (UNEP, 2000a). A nivel mundial México es un importante productor de metales (Ag, As, Au, Cu, Pb, Sn, Zn), de modo que la minería es una actividad económica importante (SE, 2004; INEGI, 2007; SGM, 2007). Sin embargo, la minería esta considerada como una actividad productiva de alto impacto ambiental ya que es fuente importante de los metales y metaloides que contribuyen significativamente a la contaminación de los suelos, sedimentos, agua y aire (Nriagu and Pacyna, 1988; Madhavan and Subramanian, 2000; UNEP, 2000b). El impacto más obvio de la minería es la eliminación de la vegetación, que a su vez altera la disponibilidad de alimento y refugio para la fauna silvestre, por lo que la diversidad biológica se puede ver afectada.

Existen diversos estudios que se han realizado en fauna terrestre asociada a sitios mineros. En cuanto a la exposición a metales en tejidos (hígado y riñón) de roedores silvestres (Talmage and Walton, 1991; Erry *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Milton *et al.*, 2003; Ieradi *et al.*, 2003; Sumbera *et al.*, 2003; Swiergosz-Kowalewska *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Jasso *et al.*, 2007). Respecto a los efectos en pequeños mamíferos (Da Silva *et al.*, 2000; Festa *et al.*, 2003; Ieradi *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2006; Jasso *et al.*, 2007).

En un estudio previo realizado por Jasso *et al.*, (2007) demostró que los roedores nativos (*Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni*) capturados en el sitio minero de Villa de la Paz tienen mayores niveles de arsénico, plomo y cadmio en tejidos (hígado y riñón)



comparados con los roedores capturados en el sitio de referencia. También, realizaron el ensayo cometa (genotoxicidad) y registraron que los organismos capturados en Villa de la Paz presentan mayor fragmentación del ADN en comparación con los roedores del sitio de referencia.

En todos los estudios mencionados anteriormente se evaluaron efectos hasta nivel molecular en pequeños mamíferos expuestos a metales y metaloides en sitios mineros. Este tipo de trabajos son importantes pero generalmente tienen poca relevancia ecológica. Por esta razón, en el presente estudio nos enfocamos en evaluar los efectos en niveles de organización biológica superiores tales como individuo, población y comunidad. Para realizar lo anterior se establecieron los siguientes pasos; a) Realizar capturas-recapturas periódicas de roedores en diferentes estaciones del año; b) Evaluar el estado de los individuos capturados (datos morfométricos, ectoparásitos, malformaciones); c) Estimar parámetros poblacionales (densidad, proporción de sexos, abundancia); d) Determinar los índices de diversidad y similitud en las comunidades de roedores. Con la finalidad de realizar comparaciones se eligió un sitio de referencia y un sitio contaminado.

Los roedores constituyen el 40% de todas las especies de mamíferos y su distribución es mundial (Nowak, 1991). Son un taxa fundamental en el equilibrio dinámico de las zonas semiáridas del Altiplano Potosino-Zacatecano, debido a que forman parte esencial de la cadena alimentaria de estos ecosistemas y también tienen un papel importante en la dispersión de semillas, además de favorecer la formación de manchones de vegetación leñosa, mismos que confieren mayor diversidad en las comunidades vegetales y animales, por lo tanto, al verse afectadas las poblaciones y comunidades de roedores necesariamente repercutirán en afectaciones a otras especies animales y vegetales (Reynolds, 1958; Price y Waser, 1985; Martinsen *et al.*, 1990, Espinosa-Reyes, 2005).

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

El distrito minero de Santa María de la Paz se localiza en las coordenadas 23° 41' longitud N y 100° 38' latitud W. Villa de la Paz es un sitio minero que ha sido explotado por más de 200 años. Con base en las concentraciones de arsénico y metales reportadas para



la zona se determinaron dos sitios de captura; Villa de la Paz fue considerado como el sitio contaminado (circulo azul) ya que se han reportado altas concentraciones de arsénico (6230.7 mg/kg), cadmio (28.4 mg/kg) y plomo (1192.3 mg/kg) en suelo (Razo *et al.*, 2004; Jasso *et al.*, 2007), mientras que en el sitio de referencia (circulo blanco) se reportan concentraciones bajas de arsénico (21.7 mg/kg), cadmio (0.8 mg/kg) y plomo (23.8 mg/kg) en suelo (Jasso *et al.*, 2007). Ambos sitios presentaron características físicas y bióticas similares (Figura 1).

<<< FIGURA 1 AQUÍ >>>

El clima predominante en la región es semiseco templado con lluvias en verano BS1kw(x´) (García, 2004); La temperatura media anual es entre 12° y 18° C; la precipitación total anual varía de 400 a 600 mm. (INEGI, 2002). En el valle los suelos dominantes son los xerosoles cálcicos y háplicos, que son suelos típicos de regiones semiáridas (INEGI, 2002). En la región existen cinco tipos de vegetación; bosque de encino-pino en las partes altas de la sierra; chaparral de Quercus en las partes medias; bosque de Juniperus en las partes bajas; en la región del abanico aluvial Matorral Desértico Rosetófilo y Matorral Desértico Micrófilo (Rzedowski, 1961). Los roedores fueron capturados en el Matorral Desértico Micrófilo ya que es ahí donde se han registrado las concentraciones mas altas de arsénico, cadmio, plomo (Razo *et al.*, 2004; Jasso *et al.*, 2007).

Captura de roedores y evaluación individual

Los roedores se capturaron con trampas Sherman para captura viva (23x9x7.5 cm), las capturas se realizaron durante dos noches consecutivas con dos repeticiones por parcela durante cinco salidas al campo. En total fueron 800 noches-trampa. Las cinco salidas al campo para la captura-recaptura de roedores se realizaron de septiembre 2005 a marzo de 2007. En cada una de las parcelas se colocaron 40 trampas Sherman arregladas en una cuadrícula de 5 x 10. A cada trampa le correspondió un número de posición invariable. Se utilizaron hojuelas de avena mezcladas con vainilla como cebo. Las trampas se revisaron por las mañanas. Para cada captura se anotó el número de la trampa y se determinó la especie de roedor. A los animales capturados se les registraron diferentes parámetros



morfométricos como longitud total, de la cola, del cuerpo, pata trasera y oreja; se les determinó el sexo y se marcaron utilizando la técnica de ectomización de falanges (Boitani y Fuller, 2000; Romero-Almaráz *et al.*, 2007). Además, se realizó una meticulosa inspección visual para determinar si presentaban ectoparásitos o malformaciones.

Estimación de parámetros a nivel población y comunidad

Para estimar la densidad poblacional se utilizó el índice de Lincon-Petersen y Jolly-Seber (Krebs, 1999). Para determinar la diversidad [número de especies (riqueza) y número de individuos de cada una de las especies (equidad)] del sitio contaminado y el de referencia se utilizó el índice de diversidad de Shannon [$H' = -\sum (p_i) (\log_n p_i)$] (Magurran, 1989; Clements y Newman, 2002). El índice de diversidad de Shannon se comparó con una t-student modificada (Zar, 1999). La similitud entre las comunidades de roedores entre el sitio contaminado y el de referencia se determinó mediante el índice de Jaccard (cualitativo) y el de Sorensen (cuantitativo).

Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas como t-student (paramétrica), U-MannWithney (No paramétricas). Los software utilizados fueron STATISTICA 6.0 y BioDAP

Permisos de recolecta

Para la captura de fauna silvestre se contó con una Licencia de Colector Científico de Flora y Fauna silvestre y otros Recursos Biológicos Silvestres No. FAUT-0133, vigente durante los años 2006 y 2007. Además, debido a que algunas de las especies que se evaluaron en este estudio se encuentran listadas en el PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008, se contó con la autorización (Oficio Num. SGPA/DGVS/06381) de la SEMARNAT para “la captura, toma de datos morfométricos, marcaje, toma de muestras de sangre, tejido y liberación inmediata del número de organismos que se consideren necesarios de los grupos de mamíferos pequeños, reptiles y anfibios que se encuentren registradas en el PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008”.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación individual y estimación de parámetros a nivel población y comunidad

Durante las cinco salidas al campo para la captura-recaptura sistemática de roedores se capturaron en total 77 roedores, 43 en el sitio de referencia y 34 en el sitio contaminado. En el sitio de referencia se capturaron seis especies pertenecientes a dos familias; Heteromyidae y Muridae y en el sitio contaminado se capturaron dos especies pertenecientes a la familia Heteromyidae. En el Cuadro 1 se muestra la abundancia relativa para las especies capturadas tanto en el sitio de referencia como en el sitio contaminado. En ambos sitios *Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni* fueron las especies más representativas. Además de ser las únicas especies capturadas en ambos sitios.

<<< CUADRO 1 AQUÍ >>>

Datos morfométricos

En el Cuadro 2 se presentan los datos morfométricos de machos y hembras de cada una de las especies capturadas. El peso y longitud (total, cola, pata trasera y oreja) determinados en los roedores evaluados son similares a los registrados por Rosenzweig y Winakur (1969) para las mismas especies en el desierto de Sonora. En la porción sur del Desierto Chihuahuense Espinosa-Reyes (2005) registró parámetros morfométricos similares para las mismas especies. También, coinciden con los mencionados en la base de datos del Museo de Zoología de la Universidad de Michigan (<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mammalia.html>) y con la base de datos de Mamíferos de Norteamérica del Museo Smithsoniano de Historia Natural (http://www.mnh.si.edu/mna/search_name.cfm). No se encontraron diferencias entre el peso y longitud total de los roedores capturados en la zona de referencia con respecto a los roedores del sitio contaminado (Figura 2; $p < 0.05$).

<<< CUADRO 2 AQUÍ >>>

<<< FIGURA 2 AQUÍ >>>



Ectoparásitos y malformaciones

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo muestran que a ningún roedor se le detectaron ectoparásitos y/o malformaciones. Acosta (2005) menciona que de las siete familias de pulgas (Siphonaptera; 17 géneros; 31 especies) que existen en México, sólo una (Rophalopsyllidae) está asociada principalmente con roedores de la familia Heteromyidae. Por lo tanto, los roedores de otras familias (Muridae, principalmente) son más propensos a ser parasitados. Como ya se mencionó, se capturaron en total 77 roedores, pertenecientes a dos familias; 85.7% Heteromyidae y 14.3% Muridae. De acuerdo al reducido número de capturas de cada una de las familias se podría explicar porqué no se registró ningún ectoparásito en este estudio.

A pesar de que existe evidencia de los efectos morfológicos de metales como arsénico, cadmio y plomo en modelos animales (Domingo, 1997), en este estudio no se registró a ningún roedor con anormalidades. Todos los registros morfométricos no indican diferencias respecto a los datos obtenidos por otros autores (Rosenzweig y Winakur, 1969; Espinosa-Reyes, 2005;

<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mammalia.html>;

http://www.mnh.si.edu/mna/search_name.cfm).

Domingo (1997) realizó una revisión en la cual se describen malformaciones en diferentes modelos animales (ratones, ratas, hámsters) expuestos a metales. Por ejemplo, se demostró que en ratones expuestos a arsénico III (10 a 12 mg/kg) se presentan anormalidades morfológicas como: micrognatia, defectos en la cola y malformaciones en las costillas. En ratones y ratas expuestos a dicloruro de cadmio (1.25 mg/kg) también se registraron efectos como: hidrocefalias y malformaciones en el esqueleto de los fetos. Se encontró que el acetato de plomo (administrado ip.) puede provocar malformaciones en el hueso sacro y en las vértebras caudales de hámsters.

Los niveles de arsénico son bajos comparados con los que mencionan en los estudios bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, las concentraciones de cadmio en hígado y riñón (0.918 ± 0.431 y 2.472 ± 0.926 $\mu\text{g}/\text{gr}$ tej. húmedo, respectivamente) determinadas en los roedores del sitio contaminado, son similares e incluso superiores, pero no se encontraron malformaciones. Lo anterior puede deberse a que se trata de especies silvestres tolerantes a



estas concertaciones de metales o bien a que los individuos con malformaciones mueren antes de llegar a estadios de subadultos o adultos.

Densidad poblacional

Debido a que no se tuvieron suficientes capturas no fue posible utilizar los índices de Lincoln-Petersen (población cerrada) y Jolly-Seber (población abierta) para realizar una buena estimación de la densidad poblacional de las especies de roedores capturadas tanto en el sitio contaminado como el de referencia.

Proporción de sexos

La proporción de sexos se estimó sólo para *Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni*, ya que para las demás especies no se obtuvo el número suficiente de capturas. Williams *et al.*, (1998) mencionan que la proporción de sexos ideal en roedores es 1:1. Las poblaciones evaluadas se mantienen cerca de esta proporción (Figura 3).

<<< FIGURA 3 AQUÍ >>>

Capturas por estación del año

El porcentaje de roedores capturados varió de acuerdo con la estación del año. En primavera se capturó el 56%, otoño 26% y en invierno 18%. Lo anterior probablemente se debió a los hábitos conductuales de las especies ya que los individuos de algunas especies presentan menor actividad en invierno. En primavera las noches son menos frías que en invierno y la época de apareamiento para la mayoría de las especies de roedores tiene lugar durante este periodo (Veal y Caire, 1979; Cornely y Baker, 1986; Zeng y Brown, 1987; Best, 1994; Espinosa-Reyes, 2005). También, podría deberse a la disponibilidad de alimento, ya que en la estación de primavera muchas especies vegetales aún no tienen hojas y mucho menos semillas, por lo tanto el cebo de las trampas resulta más atractivo para los roedores y el éxito de captura es mayor. En otoño (después de la época de lluvias) ya hay mayor disponibilidad de alimento, por lo que el cebo ya no les resulta tan atractivo y el éxito de captura disminuye. Finalmente, en invierno el menor número de capturas se puede deber a que algunas especies hibernan. Romero-Almaráz *et al.*, (2007) mencionan que el número de capturas varía ampliamente con la estación del año, la fase lunar, hábitat, densidad poblacional, entre otras;



por ejemplo, la mayoría de los roedores presentan menor actividad durante los días con luna llena. En la estación de lluvias el agua puede lavar el cebo o cerrar las trampas, por lo que el éxito de captura disminuye.

Diversidad de roedores

El índice de diversidad de Shannon (H') para la comunidad de roedores del sitio de referencia es de $H'=1.28$ y en el sitio contaminado es 0.69 (Cuadro 3; Figura 4). También se calculó el índice de similitud entre las comunidades de roedores del sitio de referencia y el sitio contaminado, el valor del índice varía de acuerdo con la prueba aplicada, por ejemplo Sorensen (0.57) y Jaccard (0.40).

<<< CUADRO 3 AQUÍ >>>

<<< FIGURA 4 AQUÍ >>>

Con base en los resultados obtenidos podemos afirmar que la comunidad de roedores del sitio de referencia es más diversa, ya que presenta una mayor riqueza de especies (seis especies en el sitio de referencia contra dos especies en el sitio contaminado). La diferencia radica en la equidad de especies, ya que en el sitio de referencia el 95.35% se reparte en cuatro especies (*Dipodomys merriami*, *Chaetodipus nelsoni*, *Peromyscus eremicus* y *P. maniculatus*), mientras que en el sitio contaminado el 100% está representado por sólo dos especies (*Dipodomys merriami* y *Chaetodipus nelsoni*).

CONCLUSIONES

No existen evidencias de que los roedores capturados presenten algún efecto a nivel individual y poblacional. A nivel de comunidad si se registró un efecto de relevancia ecológica muy importante que fue la pérdida de diversidad biológica, éste efecto no lo podemos atribuir totalmente a la contaminación, debido a que en niveles de organización biológica superiores inciden muchos factores tanto antropógenos como naturales, mismos que pueden afectar a las especies de flora y fauna de la región. Por ejemplo, la composición vegetal puede ser un factor muy importante, ya que como se mencionó anteriormente, éste trabajo se realizó en los mismos sitios en donde González-Mille (2006) registró que existe una mayor riqueza vegetal



en el sitio de referencia comparado con el sitio contaminado, por lo tanto, es factible que las especies de roedores que no se capturaron en el sitio contaminado (*Neotoma mexicana*, *Sigmodon hispidus*, *Peromyscus eremicus* y *P. maniculatus*) se hayan dispersado a otros lugares debido a que no tenían alimento. Estas especies pertenecen a la familia Muridae y no son granívoras primordiales como las especies de la familia Heteromyidae. Sin embargo, sería necesario comprobar esta hipótesis, para ello se requiere salir al campo para capturar roedores en el sitio de referencia y analizar su contenido estomacal y determinar las preferencias en su dieta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT y el FAI-UASLP.



LITERATURA CITADA

- Acosta, R. 2005. Relación huésped-parásito en pulgas (Insecta: Siphonaptera) y roedores (Mammalia: Rodentia) del estado de Querétaro, México. *Folia Entomol. Mex.*, 44(1):37-47
- Best, T. 1994. Mammalian species: *Chaetodipus nelsoni*. *The American Society of Mammalogist*. 484:1-6.
- Boitani, L. y T. K. Fuller. 2000. *Research techniques in animal ecology: Controversies and consequences*. University Press Columbia. USA. 442 p.
- Clements, W.H. y M.C. Newman. 2002. *Community ecotoxicology*. Ed. John Wiley & Sons. London, England. 336 p.
- Cornely, J. y R. Baker. 1986. Mammalian species: *Neotoma mexicana*. *The American Society of Mammalogist*. 262:1-7
- Domingo, J.L. 1997. *Metal induced development toxicity in mammals*. 395-415 pp. En: Health and Toxicology. Cheremisinoff, P.N. Ed. Gulf Professional Publishing. Houston, USA. 768 p.
- Erry, B.V.; Macnair M.R.; Meharg A.A.; Shore R.F. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Environmental Pollution*. **2000**, 110, 179-187.
- Espinosa-Reyes, G. 2005. *Organización de manchones de vegetación leñosa y su relación con roedores en el sur del Desierto Chihuahuense*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 110 p.
- García, E. 2004. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 90 p.
- González-Mille, D. 2006. *Riesgo ecológico en la zona minera de Villa de la Paz, San Luis Potosí*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 95 p.
- Ieradi, L.A.; Zima, J.; Allegra, F.; Kotlánova, E.; Campanella, L.; Grossi, R.; Cristaldi, M. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zool*. **2003**, 52, 57-66.
- INEGI, 2002. *Síntesis de información geográfica del estado de San Luis Potosí*. Aguascalientes, Ags. México. 112 p.



- INEGI. 2007. Producción minerometalúrgica en México.
<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=ind01&c=1061> (última visita mayo de 2008).
- Jasso-Pineda, Y.; Espinosa-Reyes, G.; González-Mille, D.; Razo-Soto, I.; Carrizales, L.; Torres-Dosal, A.; Mejía-Saavedra, J.; Monroy M.; Ize, A.I.; Yarto, M. and Díaz-Barriga, F. 2007. An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(3), 344-350.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological methodology*. 2^a Edition. Ed. Addison-Welsey. CA, USA. 619 p.
- Madhavan, N. and Subramanian, V. Sulphide mining as a source of arsenic in the environment. *Current Science*. **2000**, 78, 702-742.
- Magurran, A. E. 1989. *Diversidad ecológica y su medición*. VEDRA. Barcelona, España. 200 p.
- Martinsen, G. D.; J. H. Cushman; T. Whitham. 1990. Impact of pocket gopher disturbance on plant species diversity in a shortgrass prairie community. *Oecologia*. 83:132-138.
- Milton, A.; Cooke, J.A.; Johnson, M.S. Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, 44, 405-411.
- Nowak, R. 1991. *Walker's mammals of the world: Rodentia*. 5th Edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland. USA. 1712 p.
- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*. **1988**, 333, 134-139.
- Price, M. V. y N. M Waser. 1985. Microhabitat use by Heteromyid rodents: effects of artificial seed patches. *Ecology*. 66:211-219.
- PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. D.O.F. 5 de diciembre de 2008. México D.F. 96 p.



- Razo, I.; Carrizales, L.; Castro, J.; Díaz-Barriga, F.; Monroy, M. 2004. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, air and soil Pollution.*, 152, 129-152.
- Reynolds, H. 1958. The ecology of the Merriam kangaroo rat (*Dipodomys merriami* Mearns) on the grazing lands of southern Arizona. *Ecological Monographs*. 28:110-127.
- Reynolds, K.D.; Schwarz, M.S.; McFarland, C.A.; McBride, T.; Adair, B.; Strauss, R.E.; Cobb, G.P.; Hooper, M.J.; McMurry, S. 2006. Northern pocket gophers (*Thomomys talpoides*) as biomonitors of environmental metal contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:458-469
- Romero-Almaráz, M.; C. Sánchez-Hernández; C. García-Estrada; R. Owen. 2007. *Mamíferos pequeños: Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio*. 2ª Ed. UNAM. México. D. F. 201 p.
- Rosenzweig, M. L. y J. Winakur. 1969. Population ecology of desert rodent communities: habitats and environmental complexity. *Ecology*. 50:558-572.
- Rzedowski, J. 1961. *Vegetación del estado de San Luis Potosí*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 228 p.
- SE. 2004. *Informe de la minería Mexicana*. Secretaría de Economía. México. D.F. 51.
- SGM. 2007. *Anuario estadístico de la Minería Mexicana ampliada*. Servicio Geológico Mexicano y Secretaría de Economía. México, D.F. 481.
- Sumbera, R.; Barus, V.; and Tenora, F. Heavy metals in the silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus* (Bathyergidae, Rodentia) from Malawi. *Folia Zool.* **2003**, 52, 149-153
- Swiergosz-Kowalewska, R.; Gramatyka, M.; Reczynsky, W. Metals distribution and interactions in tissues of shrews (*Sorex* spp.) from copper and zinc contaminated areas in Poland. *Journal of Environmental Quality*. **2005**, 34, 1519-1529
- Talmage, S.S. and Walton, B.T. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, 119, 47-145.
- Torres, K.C. and Johnson, M.L. Bioaccumulation of metals in plants, arthropods, and mice at a seasonal wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2001**, 20, 2617-2626.
- UNEP. Challenges and perspectives” (United Nations Environment Programme, Ed.). 2000a. Mining-facts, figures and environment. In: “Mining and sustainable development II. *Industry and Environ* 23:4-8.



- UNEP. Challenges and perspectives” (United Nations Environment Programme, Ed.). 2000b. Small-scale and artisanal mining. In: “Mining and sustainable development II. *Industry and Environ* 23:49.
- Veal, R. y W. Caire. 1979. Mammalian species: *Peromyscus eremicus*. *The American Society of Mammalogist*. 118:1-6.
- Williams, M.; Valle Basto, D.F.; Tamashiro R.; Cossíos, D.; Medina, F. 1998. Clases de edades y patrones de estacionalidad reproductiva en roedores de la localidad de Tambo, provincia de Canta. *Revista de la Asociación Peruana de Ecología*, 1(1):102-106
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4^a Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, USA, pp.663 + 203 appendix.
- Zeng, Z. y J. H. Brown. 1987. Population ecology of a desert rodent: *Dipodomys merriami* in the Chihuahuan Desert. *Ecology*. 68:1348-1340.



Cuadro 1.- Especies capturadas en el sitio minero de Villa de la Paz, San Luis Potosí.

Sitio	Familia	Especies	Acrónimo	Abundancia Relativa
Referencia	Muridae	<i>Sigmodon hispidus</i>	Sihi	2.33
		<i>Neotoma mexicana</i>	Neme	2.33
		<i>Peromyscus maniculatus</i>	Pema	9.30
		<i>P. eremicus</i>	Peer	11.63
	Heteromyidae	<i>Chaetodipus nelsoni</i>	Chne	18.60
		<i>Dipodomys merriami</i>	Dime	55.81
Contaminado	Heteromyidae	<i>Chaetodipus nelsoni</i>	Chne	47.06
		<i>Dipodomys merriami</i>	Dime	52.94

Cuadro 2.- Datos morfométricos por sexo de las especies de roedores capturadas en los sitios de referencia y contaminado

Sitio	Especie	Sexo (n)	Peso (g)	Longitud media (cm ± SE)			
				Total	Cola	Pata	Oreja
Referencia	Chne	♂ (5)	13.20 ± (0.79)	15.84 ± (0.21)	9.50 ± (0.08)	2.16 ± (0.04)	0.68 ± (0.08)
		♀ (3)	13.57 ± (1.55)	15.60 ± (0.15)	9.63 ± (0.08)	2.13 ± (0.02)	0.73 ± (0.03)
	Dime	♂ (18)	46.43 ± (2.26)	24.25 ± (0.52)	15.28 ± (0.32)	3.79 ± (0.04)	1.05 ± (0.06)
		♀ (6)	44.25 ± (1.78)	23.77 ± (0.29)	14.63 ± (0.26)	3.76 ± (0.04)	0.89 ± (0.06)
	Peer	♂ (2)	18.00 ± (0)	15.05 ± (0.75)	8.15 ± (0.15)	1.30 ± (0.40)	1.65 ± (0.15)
		♀ (3)	18.67 ± (2.33)	15.37 ± (0.83)	8.93 ± (0.47)	1.90 ± (0)	1.33 ± (0.03)
	Pema	♂ (4)	16.75 ± (0.95)	15.88 ± (0.20)	9.10 ± (0.11)	1.25 ± (0.06)	1.58 ± (0.09)
		♀ (0)	----	----	----	----	----
Contaminado	Chne	♂ (8)	14.38 ± (0.71)	14.41 ± (0.28)	7.64 ± (0.25)	2.21 ± (0.01)	0.70 ± (0.03)
		♀ (8)	12.76 ± (0.59)	14.83 ± (0.26)	8.90 ± (0.28)	2.16 ± (0.05)	0.72 ± (0.04)
	Dime	♂ (9)	46.83 ± (0.95)	25.88 ± (0.52)	15.70 ± (0.43)	3.74 ± (0.03)	1.14 ± (0.05)
		♀ (9)	38.01 ± (1.96)	23.80 ± (0.55)	14.79 ± (0.41)	3.58 ± (0.04)	1.22 ± (0.04)

Cuadro 3.- Comparación de índices de diversidad entre el sitio de referencia y el sitio contaminado.

Sitio	Índice de diversidad de Shannon (H')	Varianzas	Valor de t		p
Referencia	1.28	0.0176	Obtenido	Tablas _(0.01; 42)	< 0.01
Contaminado	0.69	0.0001	4.48	2.70	



Figura 1.- Ubicación de los sitios de captura en la región minera de Villa de la Paz, San Luis Potosí, México. Sitio contaminado (círculo azul); sitio de referencia (círculo blanco).

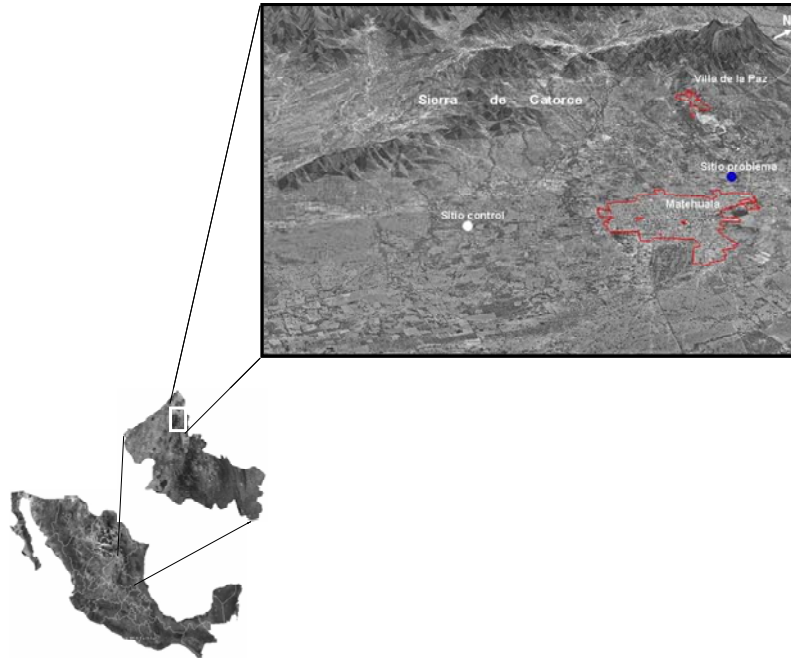


Figura 2.- Comparación del peso (g media±E.E.) y longitud totales (cm. media±E.E.) de los roedores capturados en los sitios de referencia y contaminado.

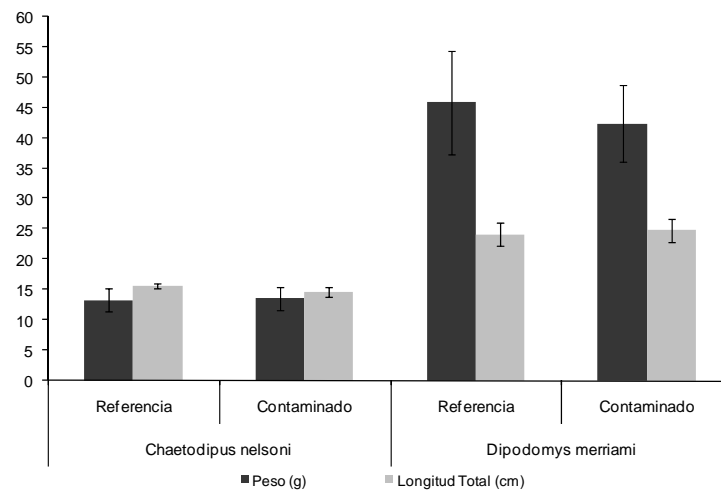




Figura 3.- Proporción de sexos de los roedores más abundantes en los sitios de referencia y contaminado.

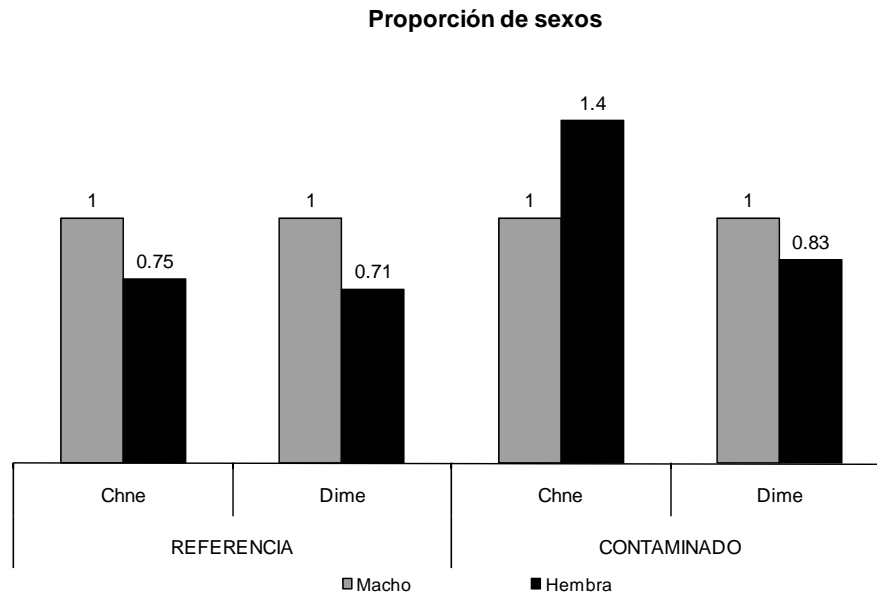
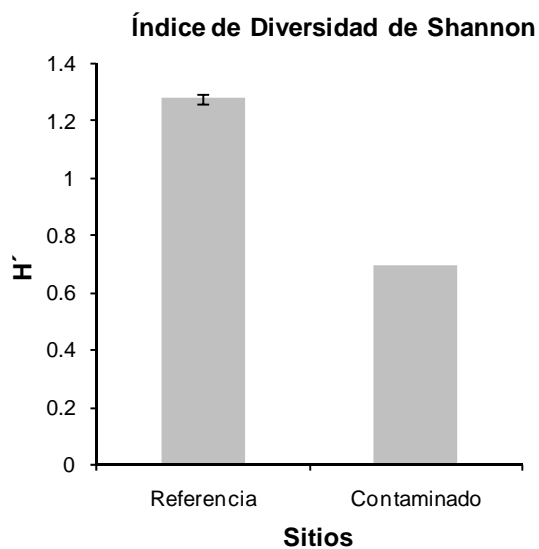


Figura 4.- Índice de diversidad de Shannon en los sitios referencia y contaminado.





**QUINTO ARTÍCULO.- DNA damage in earthworms (*Eisenia*
spp.) as indicator of environmental stress in the industrial zone
Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico**

Artículo enviado a la revista. *Journal of Environmental Science and Health A*. [En
revisión]



DNA Damage in Earthworms (*Eisenia* spp.) as an Indicator of Environmental Stress in the Industrial Zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico

Guillermo Espinosa-Reyes¹, Cesar A. Ilizaliturri¹, Donaji J. González-Mille¹, Rogelio Costilla¹, Fernando Díaz-Barriga¹, María del Carmen Cuevas², Miguel Ángel Martínez³, and Jesús Mejía-Saavedra^{1*}

¹Departamento de Toxicología Ambiental, UASLP, San Luis Potosí, México.

²Facultad de Química, Universidad Veracruzana *campus* Coatzacoalcos. Veracruz, México.

³Instituto Nacional de Ecología (INE) México D. F. CP 04530.

*Address correspondence to: José de Jesús Mejía-Saavedra, Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Avenida Venustiano Carranza 2405, Col. Lomas Los Filtros, CP 78210, San Luis Potosí, SLP, México. Phone and fax: (52-444) 826-2354; E-mail: jjesus@uaslp.mx



ABSTRACT

Coatzacoalcos, Veracruz is one of the major industrial areas of Mexico. Presently, the Coatzacoalcos River and the areas surrounding the industrial complex are considered by various authors to be some of most polluted sites in Mexico. The objective of this study was to determine if earthworms can be used as indicators of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. Often, detritivores and decomposers such as earthworms, are the first to be affected when the soil is contaminated. We collected soil samples for POPs quantification by gas chromatography. Concentrations of Hexachlorobenzene, Lindane and total PCBs in the soil were above the maximum permissible limits of the Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG). Comet assay was conducted in coelomocytes of wild earthworms collected in Coatzacoalcos and compared with the control earthworms. We found DNA damage in earthworms from Coatzacoalcos that was significantly higher ($p < 0.05$) as compared to laboratory earthworms. Earthworms are an appropriate organism to use as an indicator of environmental impact in contaminated sites. DNA damage recorded in the earthworms is clear evidence of environmental impacts on the wildlife of this region caused by the chemical industry.

Key words: Comet assay; Earthworms, Coelomocytes, POP's, Coatzacoalcos



INTRODUCTION

Coatzacoalcos, Veracruz is one of the major industrial areas of Mexico. Presently, the Coatzacoalcos River and the areas surrounding the industrial complex are considered by various authors to be some of the most polluted sites in Mexico. Several of the most important petrochemical complexes of Mexico, Cangrejera, Morelos and Pajaritos, are located in this region. There have been various toxic substances present in this area in different environmental and biological compartments, including persistent organic pollutants (POPs),^[1] polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), volatile organic compounds (VOCs),^[2] polybrominated compounds,^[3] dioxins^[4] and metals.^[1, 5, 6] Moreover, in addition to industrial activity, there has been a significant contribution of other compounds in the region, such as DDT and other pesticides to control vectors of human diseases, mainly malaria.

The following describes the origin and principle uses of POP's that have been registered in Coatzacoalcos: Hexachlorocyclohexane (HCH) is a manufactured chemical from which, theoretically, there are eight isomers. The three most common are α -HCH, β -HCH and γ -HCH (commonly called lindane). Lindane was used as a pesticide on fruit and vegetable crops and forest plantations. It was also found in medications such as lotions, creams and shampoos to treat diseases such as scabies and pediculosis (lice). There are no records indicating that lindane has been manufactured in Mexico; however, approximately 20 tons per year of this compound are imported and subsequently formulated in Mexico. Currently lindane is authorized for use in Mexico for ectoparasite control in livestock for ticks, fleas, and common fly larvae. It is also registered for use as a seed treatment for oats, barley, beans, corn, sorghum



and wheat. Pharmaceutical uses of lindane in Mexico include formulation of creams and shampoos for scabies and lice treatment. [7, 8]

In 1994 the Canadian Environmental Protection Act (CEPA) proclaimed Hexachlorobenzene (HCB) as highly toxic. HCB is a manufactured chemical which was used as a wood preservative, as a fungicide for treating seeds and as an intermediary in organic syntheses. Additionally, hexachlorobenzene may be formed as an unwanted by-product in the synthesis of other organochlorine compounds from high-temperature sources. [9, 10]

Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) is a synthetic organochlorine compound, which is relatively stable with slow degradation by sunlight or oxidation, and good absorption and resistance to biodegradation in sediments and soils and is insoluble in water. [11] In 1945 DDT was used for the first time in Mexico for the control of Malaria. The use of DDT in the malaria control program was abandoned in the year 2000, when it was replaced by pyrethroids. Also, in the period between the 1950s and 1970s, DDT was widely applied to different crops. [12]

Polychlorinated biphenyls (PCBs) were used as coolants and lubricants in transformers, capacitors, and other electrical equipment because they don't burn easily and are good insulators. PCBs are created as unintentional by-products from many of the processes that generate dioxins. They are produced during the combustion of organic materials containing chlorine as well as during the manufacture of various chlorine containing chemicals, such as ethylene dichloride. Existing unintentional sources include electric arc furnaces, shredders, sinter plants, cement plants, crematoria, and coal-based power plants. [13]

Earthworms play a major role in facilitating key interactions within ecosystems through the mixing and translocation of soil constituents, or serving as a conduit for transport of contaminants to predators at higher trophic levels. [14, 15] Earthworms have been used



extensively in ecotoxicology as biomonitors ^[16-22] to assess the effects of diffused contaminants present in soils.

DNA Damage

Genome is the set of genetic information necessary for the functioning of an individual; such information is encoded in DNA molecules. All the basic components of DNA (nitrogen bases and sugars) are possible targets of chemical alterations by genotoxic agents such as persistent organic pollutants (POPs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals. ^[23] The use of the comet assay (alkaline single cell-gel electrophoresis) facilitates the measurement of intra-cellular DNA damage induction over a broad spectrum of relevant environmental exposures. ^[24] The level of strand breakage in DNA has been proposed as a sensitive indicator of genotoxicity and an effective biomarker in environmental biomonitoring. ^[25] Comet assay is characterized as a method which is sensitive, rapid, simple, inexpensive and applicable to various types of eukaryotic cells. ^[26] The technique of Singh et al. ^[27] under lysis electrophoresis and alkaline (pH > 13) conditions, enables analysis of DNA migration due to breaks in the single strand of DNA and alkali-labile sites. ^[28] The comet assay is widely used to detect damage in vitro or in vivo caused to DNA by genotoxic agents in individual cells. ^[29-31]

There are several different forms in which contaminants can cause damage to DNA. Lee and Steinert ^[32] mention that these chemicals can be grouped into four classes: (a) chemicals that act directly on DNA; (b) chemicals whose metabolites cause DNA damage; (c) chemicals that cause the production of reactive oxygen species that can damage DNA; and (d) chemicals that



inhibit DNA synthesis and repair. In addition, many chemical contaminants damage DNA by multiple mechanisms.

In Coatzacoalcos, different pollutants with DNA damaging characteristics have been recorded; therefore, the objective of this study was to determine the DNA damage in a representative component of terrestrial fauna. To achieve the above, soil samples were collected in order to determine the concentrations of POPs using gas chromatography coupled with mass-spectrometry detection. The DNA damage was assessed by comet assay testing in the wild earthworms and then compared with that of the control (culture) earthworms.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

The industrial zone of Coatzacoalcos is located in southeastern Veracruz State, in the municipality of the same name, at 8°18'56" N and 94°24'41" W. The average altitude is 14 m. The climate is categorized as tropical monsoon [Am (i) gw"] according to the Koppen-Geiger climate classification system.^[33] The average annual temperature is 24.5° C and the average annual rainfall is 2780.1 mm.

<<< FIGURE 1 HERE >>>

Earthworm Collection



Control earthworms (*Eisenia fetida*) were obtained commercially (Ecology Institute, Veracruz). In Coatzacoalcos the wild earthworms (*Eisenia* sp.) were collected by excavation. Approximately 2 kg of soil containing earthworms was extracted and transported to the laboratory in a receptacle, in order to preserve the *in situ* field conditions of the earthworms.

Soil sample collection and analysis of POP's

Three surface soil samples (1-5 cm) were collected from Coatzacoalcos. Soil samples were transported to the laboratory in glass containers and kept under refrigeration (4°C) until analysis. Briefly, soil samples (1 gr) were microwave (CEM-MARS X) extracted in 14 ml of dichloromethane (Burdick & Jackson /HPLC) and 1ml of internal standard (PCB 141-C₁₃ and γ -HCH-C₁₃) (Ultra Scientific analytical solutions North Kingstown USA). After the extraction, samples were evaporated at 37°C to a volume of 0.2 ml by nitrogen current, and then were re-suspended to 2.0 ml with hexane (Burdick & Jackson /HPLC). Finally, the extract was cleaned in a Fluorisil column (J.T. Baker-MgO·3.6 SiO₂) where the extraction was conducted with 6 % diethyl ether (Burdick & Jackson Brand) in hexane and concentrated to 1 ml by nitrogen current. Analyses were completed on a Hewlett Packard 6890 Series gas chromatograph Hewlett Packard, Atlanta, GA, equipped with an HP 6890 automatic injector and a Hewlett Packard 5973 mass spectrometer. Helium was used as the carrier gas, and all injections (2 μ L) were made in split pulse mode onto a HP5-MS column, 60 m x 0.25 mm ID, 0.25- μ m film thickness (J&W Scientific, Bellefonte, PA, USA). The injector temperature was set at 250°C. The GC temperature program was as follows: 100°C for 2 min, ramp 20°C/min to 200°C, hold for 0 min, then ramp 15°C/min to 310°C, hold for 5 min. γ -HCH-C₁₃ and PCB-141-C₁₃ were added to all samples as internal standards. Individual compounds were used as quality control



(Ultra Scientific analytical solutions North Kingstown USA). The standards consisted of a 41 PCB mixture and 14 organochlorinated compounds. The mass spectrum was detected for the 55 individual compounds using SCAN mode for finding ions and retention time. Samples were analyzed using selective ion monitoring mode (SIM). The calibration curve was 2 to 100 ppb, in blank samples was added 50 ppb of the 55 compounds, obtained recoveries of 82% to 115%, we used Certified Reference Standards EC-2 “A Lake Ontario Blended Sediment for Toxic Organics” of National Water Research Institute, Canada, obtained accuracy 78% to 114% for 24 congeners of PCBs and 2 organochlorinated compounds.

Comet Assay

Single cell gel electrophoresis was performed as described by Singh et al. ^[27] with slight modifications. Control samples consisted of nine cultured earthworms Experimental samples consisted of eleven earthworms from the Coatzacoalcos site. The earthworms were placed in eppendorfs with 150 μ L of RPMI (M.P. Biomedical) and were left for two minutes in order to obtain coelomic fluid. An aliquot of this mixture of coelomocytes+RPMI was diluted in agarose of low melting point (Sigma) (37°C). The slides were prepared by adding 30 μ L of the mixture of coelomic fluid+RPMI and 225 μ L of agarosa of low melting point to a pre-prepared layer of regular agarose (Sigma) at 0.5 %. Following the solidification of the agarose, the cells were placed in a lysis solution consisting of 10 mM Tris-HCl (Sigma), 2.5 M NaCl (J.T. Baker/ACS) and 0.1 M Na₂EDTA (Sigma/Molecular biology tested), pH 10, to which 10% DMSO (Sigma/Molecular biology tested), and 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) were added just before use. The solution was chilled prior to use and the lysis duration was a maximum of 24 hours at 4°C. Slides were incubated in an alkaline buffer (300 mM NaOH (J.T. Baker/ACS)



and 10 mM Na₂EDTA pH >13) for 5 min. After alkali incubation, the electrophoresis was performed in the same buffer (pH >13) for 5 min at 25 V and 300 mA. All procedures were performed under very dim, indirect light and conducted at a temperature of 4°C. After electrophoresis, slides were gently washed with 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), and then dehydrated in ethanol. The slides were stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich) (20 µl of a 20 µg/ml solution), and a glass cover was placed over the gel. The level of DNA damage in coelomocytes was analyzed in 100 cells (duplication of 50 randomly selected cell nuclei) using an epifluorescent microscope (Nikon Eclipse E400). The comet image magnification was 200x. Olive tail moment [(tail mean – head mean) x tail %DNA/100] and tail length were measured through image analysis (Komet, version 4; Kinetic Imaging Ltd., Bromborough, U.K.). Prior to analysis, all slides were independently coded (they were scored without knowledge of the code).

Statistical Analysis

The data did not present a normal distribution, therefore a non parametric test was used (Mann-Whitney U Test) to compare the olive tail moment and the tail length of the control earthworms and the field earthworms. The level of statistical significance was $p < 0.05$. The analysis was conducted using STATISTICA version 8.0. StatSoft, Tulsa, USA.

RESULTS AND DISCUSSION

POP's Concentration in Soil



Figure 1 shows the values of persistent organic pollutants in soil samples (n = 3).

Concentrations above the maximum permissible limits of the Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG) were present for the following compounds: Hexachlorobenzene, Lindane, and the sum of Polychlorinated Biphenyl Compounds. Previous studies conducted in Coatzacoalcos have also identified these contaminants in different environmental and biological samples. ^[1, 3, 4]

<<< FIGURE 2 HERE >>>

All pollutants showed in Figure 1 are highly persistent in the environment, lipophilic, highly toxic and have the ability to bioaccumulate and biomagnify through the food chain. The available genotoxicity data indicate that α -HCH (lindane) and other HCH isomers have some genotoxic potential, but the evidence for this is not conclusive. ^[7] It has been shown that some PCB congeners ^[34] as well as DDT and its metabolites ^[35, 36] are genotoxic. No studies were located regarding genotoxic effects of animal exposure to Hexachlorobenzene. ^[37]

Potential Sources of POPs in Soil Samples

The HCH technical degree production produces five isomers in different proportions α -HCH (60-70%), β -HCH (5-12%), γ -HCH (10-15%), δ -HCH (6-10%) and ϵ -HCH (3-4%). For every ton of lindane (γ -MBM) produced is estimated to be generated from 8 to 9 tons of waste. ^[8]

The results obtained in the soil sample analyses were consistent with the proportions mentioned above: α -HCH (71.41%), β -HCH (8.27%) γ -HCH (20.32%). This indicated us that probably using HCH technical degree and not only lindane. As mentioned previously, one of



lindane's main uses is for the control of different ectoparasites in livestock, so it is very likely that the high concentrations of α - β - γ -HCH found in the Coatzacoalcos samples have resulted from this activity. Coatzacoalcos, Minatitlán and Hidalgotitlán have reported 28,455; 312,900 and 124,930 head of dual purpose (meat and milk) cattle (respectively) ^[38]. All of these communities contribute runoff into the Coatzacoalcos River. Other researchers evaluating this area have also observed lindane concentrations in environmental samples (G. Gold B., Com. pers., 2008). It's known that the main source of HCB is the production of vinyl chloride monomer (VCM) and chlorinated solvents ^[37] and these compounds are generated in the industrial complex of Coatzacoalcos. The presence of DDE (DDT metabolite) in the environment can be attributed to Coatzacoalcos as an endemic region of malaria, where DDT was applied for vector control. ^[39] PCBs have remained in place in old equipment such as electrical transformers in many locations. It's possible that the largest reservoir of PCBs at a site in the industrial complex would be transformers at electrical substations; however, based on the current evidence it is not possible suggest any source of the PCBs.

Currently, the Coatzacoalcos River is being dredged so that boats can maneuver into the refinery in Minatitlán, and also to prepare the ground for residential housing construction. Therefore, the organic compounds attached or "captured" in the sediment are being assimilated through increased exposure of animal and plant species of the region, increasing their potential effects (Pers. Obs., 2008).

As a signatory of the Stockholm Convention, Mexico is committed to establishing measures for the elimination or reduction of the use of different Persistent Organic Pollutants.



A National Implementation Plan (NIP) ^[40] has already been employed in Mexico, aimed at complying with the agreement of the Stockholm Convention. Additionally, agreements have been established with Canada and the United States for the same purpose (i.e. PARAN). ^[40] Therefore, the high levels of POPs registered in the environment are probably due to the indiscriminate, inappropriate and perhaps clandestine use of these compounds over many years (mainly through pesticides) coupled with their high persistence.

DNA Damage in Earthworms

Figure 2 shows the olive tail moment $[(\text{tail mean} - \text{head mean}) \times \text{tail \%DNA}/100]$ and the comet tail length (μm) of earthworms in the laboratory and the industrial zone (Coatzacoalcos) samples. The damage to DNA was higher in the earthworms of Coatzacoalcos, and in both cases there was statistical difference ($p < 0.05$). Figure 3 shows images of earthworm coelomocytes from the laboratory and field samples.

Various authors ^[41, 42] mention that the comet assay performed on earthworms is an ideal method to monitor and detect genotoxic compounds in terrestrial ecosystems. There are several works which have used the comet assay in earthworms exposed to different pollutants. Verschaeve et al. ^[43] demonstrated a dose - response with the extent of DNA damage in coelomocytes from soil treated with different chemicals. Salagovic et al. ^[41] mentioned increased DNA damage in coelomocytes when worms were exposed to soil samples from polluted coke oven sites or contaminated industrialized areas ^[44] and also in sediment samples from polluted river systems. ^[24]



<<< FIGURE 3 HERE >>>

<<< FIGURE 4 HERE >>>

Fourie et al. ^[45] conducted a study which assessed the damage to DNA in five species of earthworms (*Amyntas diffringens*, *Aporrectodea caliginosa*, *Dendrodrilus rubidus*, *Eisenia fetida* and *Microchaetus benhami*) following their exposure to different doses of cadmium. They demonstrated that the earthworms of the genus *Eisenia* were the most sensitive, and based on the results obtained by Fourie et al. ^[45] the selection of earthworms from the genus *Eisenia* was suitable for use as biomonitors in terrestrial ecosystems.

Other biomarkers could be used to assess genotoxicity in organisms exposed to a mixture of pollutants such as chromosomal aberrations, sister chromat exchanges, and micronucleus assay, however, the comet assay has several advantages such as sensitivity to low levels of DNA damage. It requires few cells per sample, is inexpensive, can be done in the field, and it requires little time to conduct a full study. With the data generated is possible to perform a strong statistical analysis. Furthermore, Dhawan et al. ^[46] mention that the comet assay is now well established, and its versatility has provided toxicologists with a sensitive tool for assessing DNA damage. This has been demonstrated through its wide application in assessing genotoxicity in plant and animal samples, both aquatic and terrestrial, in a variety of organisms, tissues, and cell types, and this biomarker can be extrapolated to different species of plants and animals.



Coelomocytes are considered the immune system cells of lower coelomate animals (annelida, mollusca and arthropoda). Therefore, if there is damage in these cells it is possible to predict a potential immunosuppressive effect on individuals exposed to pollutants in Coatzacoalcos. However, no morphological abnormalities were detected in the earthworms collected in Coatzacoalcos.

The principal limitation of the work involved in this study is that the investigation only identified POPs in soil and, as mentioned above, the comet assay is an unspecific biomarker and highly sensitive. Previous studies in the region of Coatzacoalcos have identified other pollutants^[1, 3 - 6] such as PAHs, some metals, dioxin and vinyl chloride which are classified as genotoxic. There are different environmental stressors that could cause damage to DNA. Therefore, it is recommended that the analysis of other pollutants in Coatzacoalcos be performed.

CONCLUSIONS

Earthworms are readily available, have relatively short life cycles, do not move long distances and are easy to handle. Therefore, the study proposed that they can be used as biomonitors of environmental impact in contaminated sites, and that comet assay could be included as a biomarker in ecotoxicological studies on these soil organisms. The current study demonstrated that DNA damage was higher in the earthworms of the industrial zone, because of the presence of Pollutants Organic Persistent (HCB, lindane and total PCBs) in soil samples. DNA damage is weighted evidence of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos.



ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the National Institute of Ecology, SEMARNAT. We also thank to the Veracruz University *campus* Coatzacoalcos. We also thank Biol. Susan Quackenbush for English language editing of the manuscript.

REFERENCES

1. Stringer, R.; Labunska, I.; Bridgen, K. *Organochlorine and heavy metals contaminants in the environmental around the Complejo Petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, México*.
Technique note Greenpeace. University of Exeter. U.K. 2001, 60.
2. Riojas-Rodriguez H.; Baltazar-Reyes, M.C., Meneses, F. Volatile organic compound presence in environmental samples near a petrochemical complex in Mexico. *Abstracts Epidemiology*.
2008, *19* (1), S219.
3. Blake, A. *The next generation of POP's: PBDE's and lindane*. International POP's Elimination Network (IPEN). Washington D.C. USA. 2005, 15.
4. Petrlin, J., J. DiGangi. *The egg report*. International POP's Elimination Network (IPEN).
Washington D.C. USA. 2005, 52.
5. Vázquez-Botello, A.; Villanueva-Fragoso, S.; Rosales-Hoz, L. Distribución y contaminación por metales en el Golfo de México. In: *Diagnostico ambiental del Golfo de México*. Caso, M. Pisanty, I.; Ezcurra, E., Eds.; SEMARNAT-INE. 2004, 682-712.



6. Rosales, L. Carranza, E. Estudio geoquímico de metales en el estuario del río Coatzacoalcos.
In: *Golfo de México contaminación e impacto ambiental: diagnostico y tendencias*. Vázquez-Botello, A.; Rendón-Von Osten, J.; Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernández, C., Eds.;
Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 2005, 389-406.

7. ATSDR. *Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma- and delta-hexachlorocyclohexane*.
Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases
Registry. 2005, 377.

8. CEC. *The North American regional action plan (NARAP) on lindane and other
hexachlorocyclohexane (HCH) isomers*. Commission for Environmental Cooperation. 2006,
51.

9. Newhook, R., Meek, M.E. Hexachlorobenzene: evaluation of risks to health from
environmental exposure in Canada. *Environ. Carcin. Ecotox. Revs.* **1994**, *12*(2), 345-360.

10. Sala, M.; Sunyer, O.; Otero, R.; Santiago-Silva, M.; Ozalla, D.; Herrero, C.; To-Figueras, J.;
Kogevinas, M.; Anto, J.; Camps, C.; Grimalt, J. Health effects of chronic high exposure to
hexachlorobenzene in a general population sample. *Arch. Environ. Health.* **1999**, *54*(2), 102-
109.



11. CEC. *Diagnostico Situacional del Uso de DDT y el Control de la Malaria*. Commission for Environmental Cooperation. 2001. Available in:
http://www.cec.org/files/PDF/POLLUTANTS/InfRegDDTb_ES_EN.pdf (accessed Jul 2008)

12. CEC. *Historia del DDT en Norteamérica*. Commission for Environmental Cooperation. 1997. Available in: http://www.cec.org/files/PDF/POLLUTANTS/historiaDDTs_ES.PDF (accessed Jul 2008)

13. Lutharddt, P.; Mayer, J.; Fuchs, J. Total TEQ emissions (PCDD/F and PCB) from industrial sources, *Chemosphere*. **2002**, *46*, 1303-1308.

14. Harris, M.L.; Wilson, L.K.; Elliott, J.E.; Bishop, C.A.; Tomlin, A.D.; Henning, K.V. Transfer of DDT and metabolites from fruit orchard soils to American Robins (*Turdus migratorius*) twenty years after agricultural use of DDT in Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *39*, 205-220.

15. Langdon, C.J., Pearce, T.G., Meharg, A.A., Semple, K.T., Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. *Environ. Pollut.* **2003**, *124*, 361-373.

16. Fitzpatrick, L.C.; Sassani, R.; Venables, B.J.; Goven, A.J. Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls to earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris*. *Environ. Pollut.* **1992**, *77*, 65–69.



17. Goven, A.J.; Eyambe, G.S.; Fitzpatrick, L.C.; Venables, B.J.; Cooper, E.L. Cellular biomarkers for measuring toxicity of xenobiotics: effects of polychlorinated biphenyls on earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* **1993**, *12*, 863–870.
18. Weeks, J.M., Svendsen, C. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubells*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.* **1996**, *15*, 1801–1805.
19. Giggelman, M.A.; Fitzpatrick, L.C.; Goven, A.J.; Venables, B.J. Effects of pentachlorophenol on survival of earthworm (*Lumbricus terrestris*) and phagocytosis by their immuno active coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 2341–2394.
20. Fordsmand-Scott, J.J., Week, J.M. Biomarkers in earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *165*, 117–159.
21. Reinecke, A.J., Reinecke S.A. The use of earthworms in ecotoxicological evaluation and risk assessment: new approaches In: *Earthworm ecology*. Edwards, C.A., Ed.; St. Lucie Press. Boca Raton. U.S. 1998, 273-293.
22. Reinecke, S.A., Reinecke A.J. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *46*, 208–215.
23. Albert, L. *Toxicología ambiental*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 2004, 455.



24. Rajaguru, P.; Suba, S.; Palanivel, M.; Kalaiselvi, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* **2003**, *41*, 85-91.
25. Shugart L.R. Biological monitoring: testing for genotoxicity. In: *Biomarkers of environmental contamination*. McCarthy J.F., Shugart L.R., Eds; Lewis, Boca Raton, FL. 1990, 217–227.
26. Mckelvey-Martin, V.J.; Green, M.H.L.; Schmezer, P.; Pool-Zobel, B.L.; De Méo, M.P.; Collins, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. *Mut. Res.* **1993**, *288*, 47-63.
27. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A single technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **1988**, *175*, 184-191.
28. Speit, G., Hartmann, A. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Method. Mol. Biol.* **1999**, *113*, 203-212.
29. Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O' Neill, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mut. Res.* **1995**, *339*, 37-59.
30. Rojas, E.; López, M.C.; Valverde, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr B.* **1999**, *722*, 225-254.



31. Tice, R.R.; Agurell, E.; Andreson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, F. Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mut.* **2000**, *35*, 206-221.
32. Lee, R.F.; Steinert, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research.* **2003**, *544*, 43-64.
33. García, E. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4ª Edición. Offset Larios. México. D. F. 2004, 218.
34. ATSDR. *Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs)*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 2000, 948.
35. ATSDR. *Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 2002a. 497.
36. Pérez-Maldonado, I.N.; Herrera, C.; Batres, L.E.; González-Amaro, R.; Díaz-Barriga, F.; Yañez, L. DDT induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ. Res.* **2005**, *98*, 177-84.
37. ATSDR. *Toxicological profile for Hexachlorobenzene*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 2002b, 403.



38. INEGI. Anuario estadístico Veracruz de Ignacio de la Llave: ganadería. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2007. Available in:
http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee07/info/ver/c30_12.xls (accessed Jul 2008)
39. Bozada, L. M., Bejarano, F. *Los contaminantes orgánicos persistentes en el istmo mexicano*. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. RAPAM. México, D.F. 2006, 79.
40. Yarto, M.A.; Gavilán, A.; Barrera, J. El Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus implicaciones para México. *Gaceta Ecológica del Instituto Nacional de Ecología*. **2003**, 69:7-28 45.
41. Salagovic, J.; Gilles, J.; Verschaeve, L.; Kalina, I. The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biol (Praha)*. **1996**, 42, 17-21.
42. Zang, Y.; Zhong, Y.; Luo, Y.; Kong, Z.M. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ Pollut*. **2000**, 108 (2), 271-8.
43. Verschaeve, L.; Gilles, J. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **1995**, 54 (1), 112-119.



44. Xiao, R.Y.; Wang, Z.; Wang, C.X.; Yu, G.; Zhu, Y.G. Genotoxic risk identification of soil contamination at a major industrialized city in northeast China by a combination of in vitro and in vivo bioassays. *Environ Sci Technol.* **2006**, *40* (19), 6170-6175.

45. Fourie, F.; Reinecke, S.A.; Reinecke, A.J. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2007**, *67* (3), 361-368.

46. Dhawan, A.; Bajpayee, M.; Parmar, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. and Toxicol.* **2009**, *25* (1), 5-32.

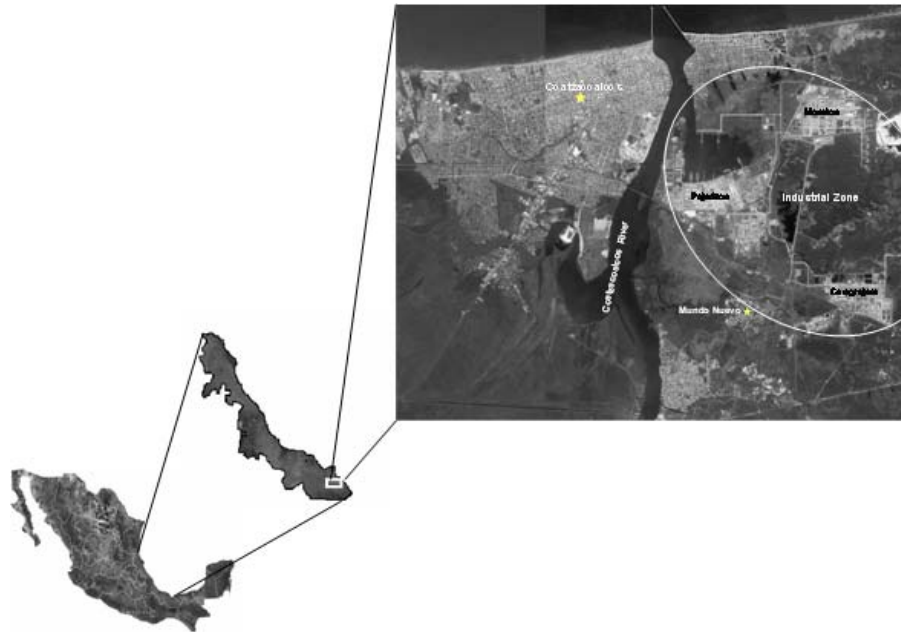


Figure 1. Localization of the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico.

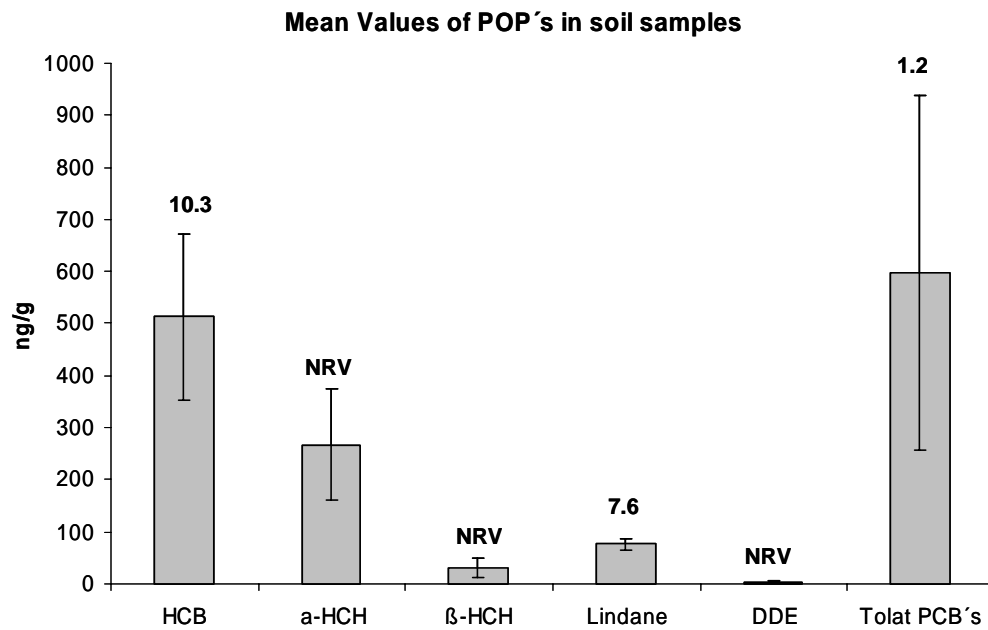


Figure 2.- POP's concentrations in soil samples (mean \pm SE; n=3). The number indicates how many times this compound is above the maximum permissible limits of the Canadian Environmental Quality Guidelines. NRV = No Reference Values.

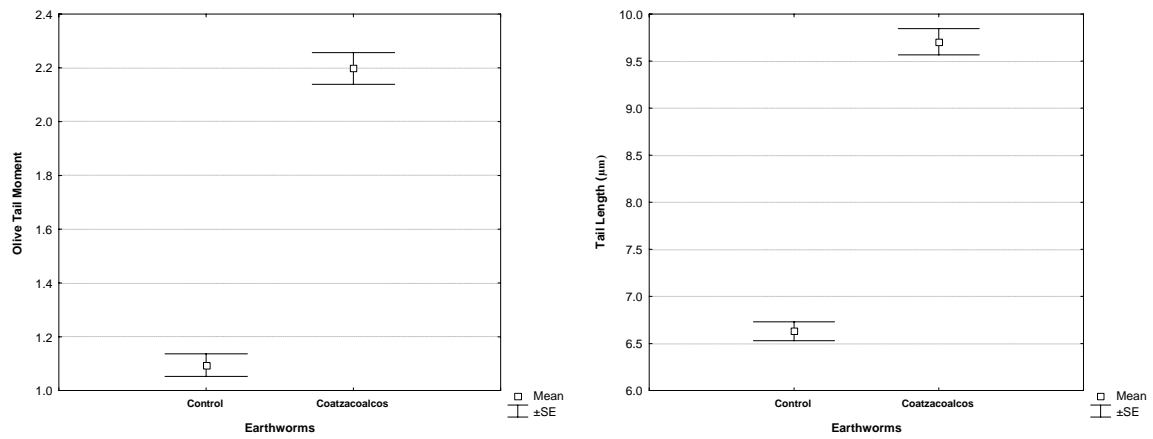


Figure 3. Comparison of moment and tail length between control and Coatzacoalcos earthworms. Mann-Whitney U test; $p < 0.05$. Control $n=9$; Coatzacoalcos $n=11$

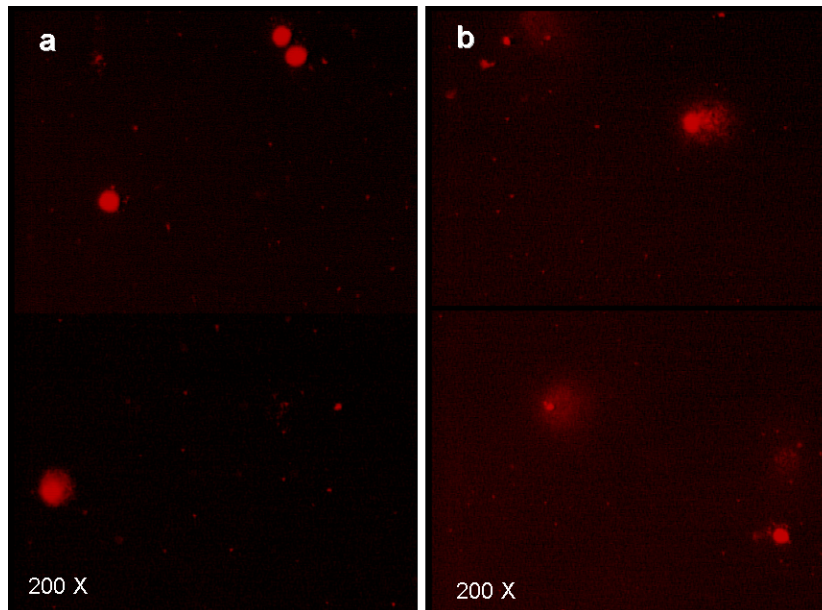


Figure 4. Coelomocytes images of control (a) and Coatzacoalcos(b) earthworms.



DISCUSIÓN GENERAL



Como se mencionó en la introducción esta tesis formó parte del diseño y aplicación de la metodología integrada de riesgos en sitios contaminados. Esta metodología pretende ser flexible con la finalidad de utilizarse en diferentes sitios contaminados. La evaluación integrada de riesgo se implementó por primera vez en el sitio minero de Villa de la Paz y posteriormente se realizó en Coatzacoalcos, Veracruz cuya principal actividad es la industrial.

Utilizando la metodología de evaluación integrada de riesgo en Villa de la Paz fue posible recabar líneas de evidencia sólidas y congruentes para establecer que existe riesgo, en los niños y en roedores silvestres que habitan en los sitios contaminados. Se determinó que hay exposición a arsénico, cadmio y plomo en niños y roedores del sitio contaminado. Tanto los niños como los roedores del sitio contaminado presentaron mayor fragmentación de ADN. Éste efecto a nivel molecular en roedores silvestres parece no impactar en los siguientes niveles de organización biológica (individuo y población), ya que no se registró ningún efecto, sin embargo, como ya se mencionó, no siempre se podrá establecer causalidad directa entre la exposición y los efectos sobre todo en niveles de organización biológica superiores. No obstante, a nivel de comunidad se registró un efecto de relevancia ecológica muy importante que fue la pérdida de diversidad biológica, éste efecto no se puede atribuir totalmente a la contaminación, debido a que en niveles de organización biológica superiores inciden muchos factores tanto antropógenos como naturales, mismos que pueden afectar a las especies de flora y fauna de la región.

La estructura de la comunidad vegetal está relacionada con la presencia/ausencia de pequeños mamíferos. Rosenzweig (1973) y Price (1978) demostraron que al alterar la composición vegetal removiendo especies arbustivas, también cambian las especies dominantes de roedores. En Villa de la Paz González-Mille (2006) demostró que existen diferencias entre la composición vegetal de los sitios contaminado y referencia. Con base en lo anterior se puede explicar el hecho de que las especies de roedores que no se capturaron en el sitio contaminado (*Neotoma mexicana*, *Sigmodon hispidus*, *Peromyscus eremicus* y *P. maniculatus*) se hayan dispersado a otros lugares debido a que no tenían alimento y/o refugio. Sin embargo, sería necesario comprobar esta hipótesis, para ello se requiere salir al campo para capturar roedores en el sitio de referencia y analizar su contenido estomacal y determinar las preferencias en su dieta. Si la hipótesis planteada es aceptada entonces se debería encontrar



mayor proporción de semillas de las especies vegetales que no se encuentran en el sitio contaminado.

En Coatzacoalcos el escenario es más complejo con respecto a Villa de la Paz, ya que aquí se presentan más grupos de contaminantes (Metales, Contaminantes Orgánicos Persistentes, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, Hidrocarburos Totales del Petróleo; Compuestos Orgánicos Volátiles y Compuestos Bromados), así como diferentes ecosistemas (acuático, humedal y terrestre) y por supuesto el escenario humano (Stringer *et al.*, 2001; Vázquez-Botello, 2004; Blake, 2005; Petrlin y DiGangi, 2005; Rosales y Carranza, 2005; Riojas-Rodríguez *et al.*, 2008). La complejidad de este sitio es evidente, por lo que se consideró un sitio ideal para implementar la metodología integrada de riesgo con la finalidad de probar que dicha metodología puede aplicarse en cualquier sitio contaminado.

Éste trabajo de tesis se enfocó en la evaluación del riesgo ecológico en fauna terrestre. Para la implementación de esta metodología se realizaron dos salidas para recabar información, mediante la recolecta de muestras ambientales (suelo y sedimento), y la captura y toma de muestra biológica de las especies de fauna terrestre seleccionadas (Anexo I). Existe incongruencia en los resultados obtenidos, tamaños de muestra pequeños, y mucha incertidumbre en los resultados. Sin embargo, hasta este momento de la investigación con la implementación de ésta metodología se han recabado algunas evidencias (ej. exposición a COPs y genotoxicidad), en tres receptores del sistema terrestre (iguanas, lombrices y cangrejos) del estrés ambiental que se está presentando en la región de Coatzacoalcos, Veracruz. Debido a que en la región de Coatzacoalcos la vegetación predominante es la de pantano, los sistemas más representativos son el acuático y el de humedal por lo que, es posible que los resultados más contundentes de que existe riesgo ecológico no se presenten en el sistema terrestre, sino en los sistemas acuático y de humedal.

Relevancia de los niveles de organización biológica

El principio de la propiedad emergente propuesto por Odum (1971) menciona que una consecuencia importante en la organización jerárquica es que los componentes o subconjuntos se combinan para producir “todos funcionales” de mayor tamaño, en los cuales emergen nuevas propiedades que no estaban presentes en el nivel inferior. En consecuencia, una propiedad emergente de un nivel ecológico o unidad no puede predecirse al estudiar los



componentes de dicho nivel o unidad. Por lo tanto, las observaciones realizadas a cualquier nivel ayudan a estudiar el siguiente, sin embargo nunca explican de manera completa los fenómenos que ocurren en ese siguiente nivel, el cual debe ser estudiado de manera independiente, para poder comprenderlo adecuadamente. Con base en lo anterior se puede establecer que a pesar de que no existe un nivel de organización más importante que otro, en la evaluación de riesgo ecológico, los efectos en niveles de organización biológica superiores tiene gran relevancia, pero el análisis de la información generada, así como su interpretación resulta ser mucho más compleja que la información generada en niveles inferiores, ya que los efectos observados seguramente son producto de una serie de factores físicos y bióticos que no se pueden controlar en condiciones de campo (Van den Brink *et al.*, 2008).

Criterios de selección de especies

En el Anexo I se mencionan cada uno de los criterios de selección con mayor detalle. En general, se tomaron en cuenta cinco características; 1) grupos de contaminantes presentes en el sitio de estudio, 2) probables rutas de exposición, 3) especies de biología bien conocida, 4) ubicación dentro de la red trófica y 5) facilidad de captura. Estas cinco características se fueron adecuando durante las diferentes etapas de la realización de esta investigación, hasta tener una lista mayor de criterios (ver Anexo I), mismos que se utilizaron para determinar que especies funcionarán como biomonitores en diferentes sitios contaminados de México dentro del Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental (PRONAME). Por ejemplo, en este proyecto inicialmente se contemplaron roedores, iguanas, lombrices, cangrejos, jaibas, peces, ostiones, sapos, tortugas y cocodrilos, la elección de tantos grupos animales se realizó con la finalidad de tener representadas de la mejor manera posible las interacciones tróficas entre los organismos seleccionados, así como su representatividad en cada uno de los sistemas (terrestre, humedal y acuático). Durante la elaboración del estudio en campo se determinó que esta selección fue muy ambiciosa y difícil de cumplir, ya que se requería un gran esfuerzo de captura y demasiado tiempo en campo (ocho semanas continuas, o bien cuatro salidas periódicas de dos semanas cada una) para lograr tener un tamaño de muestra suficientemente representativo (10 a 15 organismos por sitio) de cada uno de los sitios que se muestrearon, una estancia tan prolongada en campo elevó el costo del proyecto. Debido a este inconveniente en la



segunda fase se redujo drásticamente el número de especies con las que se continuaría el estudio. Éstas fueron lombrices (terrestre), sapos (humedal); bagres y tilapias (acuático).

Características fisicoquímicas y probables mecanismos de transporte de contaminantes

Para entender como se comporta un contaminante en el ambiente, es necesario conocer algunas de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y su mecanismo de transporte y dispersión, así como las características físicas (dirección de vientos, calima, temporada de nortes, etc.) y bióticas (tipo de suelo, tipo de vegetación, especies de fauna, etc.) del ecosistema para poder inferir los mecanismos de transporte y las posibles rutas de exposición. Por ejemplo, en Coahuila de Zaragoza la Red de Acción Sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM, s/a) publicó un documento en el cual hacen mención de un modelaje matemático de hidrocarburos, HO_x y CO (Bravo *et al.*, 1992), dicha modelación se hizo con base en las concentraciones en aire registradas por los autores y la dirección de los vientos predominantes en verano (sur – sureste). Con base en esta información y el conocimiento de algunas características fisicoquímicas de las dioxinas, PCBs y HCB la RAPAM postuló la probable área de influencia de dichos contaminantes (Figura 1). Con este tipo de herramientas de simulación es posible determinar las poblaciones en riesgo, en este caso se mencionan diferentes asentamientos urbanos que probablemente se puedan ver impactados por la pluma de contaminantes. Una de estas comunidades es Mundo Nuevo, que fue donde se recolectaron las lombrices de tierra en las cuales se detectó mayor fragmentación de ADN comparadas con lombrices de laboratorio.

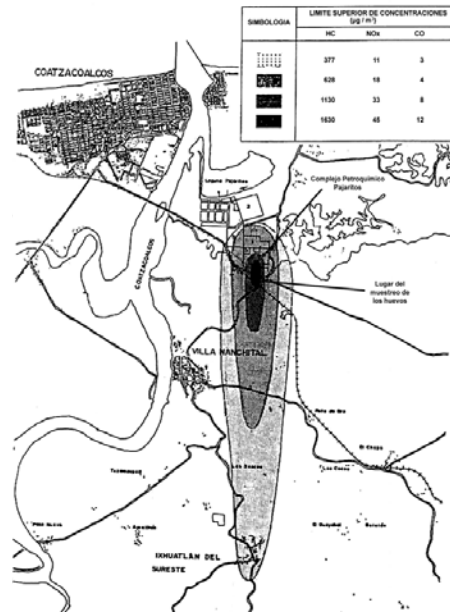


Figura 1.- Simulación matemática de la dispersión de hidrocarburos venteados NOx y CO emitidos por Pemex (Pajaritos) durante el verano.

Fuente original: Bravo *et al.*, (1992). Figura tomada de:
http://www.ipen.org/ipepweb1/library/ipep_pdf_reports/5mex%20mexico_eggsreport.pdf

En el Cuadro 1 se muestran las características fisicoquímicas más relevantes para los Contaminantes Orgánicos Persistentes registrados en la región de Coatzacoalcos. De manera general con base en estas características es posible inferir cierto comportamiento de estos compuestos, tales como volatilidad (presión de vapor y constante de la ley de Henry), persistencia en el ambiente (Koc), factibilidad de bioacumularse en cadena alimentaria (Kow). Los contaminantes con el Kow más alto tienen mayor potencial de bioacumularse, los que presentan el Koc más alto pueden adherirse a suelos y sedimentos ricos en materia orgánica, los contaminantes con presión de vapor y constante de la ley de Henry más altas son los más volátiles y se pueden dispersar más en la atmósfera.



Cuadro 1.- Características fisicoquímicas de los COPs registrados en ambiente y tejidos en Coatzacoalcos, Veracruz.

Características	Mirex	DDT	HCB	PCBs
Información química	CAS: 2385-85-5 Fórmula molecular: C ₁₀ Cl ₁₂ Peso molecular: 545.5	CAS: 50-29-3 Fórmula molecular: C ₁₄ H ₉ Cl ₅ Peso molecular: 354.49	CAS: 118-74-1 Fórmula molecular: C ₆ Cl ₆ Peso molecular: 284.78	CAS: 11097-69-1 Fórmula molecular: C ₁₂ Cl _(x+y) Peso molecular: 328 (va de 188.7-498.7)
Persistencia	Vida media: 4.2-12.5 días (aire) 0.34-1.14 años (agua) >3.4 años (suelo)	Vida media: 4.2-12.5 días (aire) 0.34-1.14 años (agua) 1.1-3.4 años (suelo)	Vida media: 417-1250 días (aire) >3.4 años (agua) >3.4 años (suelo)	Vida media: 4.2 días (aire) 5.7 años (agua) 1.14 años (suelo)
Propiedades relacionadas a su transporte ambiental	Constante de la ley de Henry: 8.3 x 10 ⁻³ atm ³ / mol a 20°C Presión de vapor: 3 x 10 ⁻⁷ mm Hg a 25°C Solubilidad en agua: 5.45 x 10 ⁻⁵ mg/L a 25°C Koc (Log coeficiente de adsorción al suelo): 5794	Constante de la ley de Henry: 1.29 x 10 ⁻⁵ atm ³ / mol a 23°C Presión de vapor: 1.6 x 10 ⁻⁷ mm Hg a 20°C Solubilidad en agua: 1.2-5.5 mg/L a 25°C Koc (Log coeficiente de adsorción al suelo): 151000	Constante de la ley de Henry: 7.1 x 10 ⁻³ atm ³ / mol a 20°C Presión de vapor: 1.089 x 10 ⁻⁵ mm Hg a 20°C Solubilidad en agua: 40 mg/L a 20°C Koc (Log coeficiente de adsorción al suelo): 50000	Constante de la ley de Henry: 2 x 10 ⁻³ atm ³ / mol a 25°C Presión de vapor: 7.71 x 10 ⁻⁵ mm Hg a 25°C Solubilidad en agua: 57 mg/L a 24°C
Bioacumulación	Kow (Log coeficiente de partición octanol-agua) : 5.28 BAF/BCF: 2400000	Kow (Log coeficiente de partición octanol-agua): 6.91 BAF/BCF: 1800000	Kow (Log coeficiente de partición octanol-agua): 3.93 BAF/BCF: 110000	BAF/BCF: 3000000

Fuentes: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>;
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>

Utilización de otros biomarcadores

Cuando se tiene un escenario tan complejo como el de Coatzacoalcos en el cual tenemos mezclas de contaminantes, tres sistemas diferentes y múltiples especies, resulta complicado elegir los biomarcadores de exposición y de efecto que se utilizarán en la evaluación del riesgo. Es importante mencionar que el proyecto: Implementación de la metodología de evaluación integrada de riesgos en sitios contaminados de México –Estudio de caso: Coatzacoalcos, Veracruz – se llevó a cabo en dos etapas.

Básicamente para elegir los biomarcadores de exposición fue necesario tomar en cuenta cuatro factores; 1) las concentraciones de contaminantes registradas en suelo y sedimento, 2) la capacidad analítica; 3) los resultados de trabajos previos realizados en la región y 4) la talla del organismo capturado. De acuerdo a lo mencionado anteriormente se eligió determinar COPs y plomo.

Respecto al biomarcador de efecto seleccionado en la primer etapa de este proyecto, se utilizó un biomarcador de efecto genotóxico (fragmentación del ADN), evaluado mediante el ensayo cometa que se mencionó en la introducción (Capítulo 1) es inespecífico, muy sensible, relativamente barato y ya se ha utilizado en especies silvestres. Éste biomarcador es ideal para utilizarlo en un escenario tan complejo, con presencia de mezcla de contaminantes.



En la segunda etapa de este proyecto se eligieron diferentes biomarcadores de efecto, los cuales son más específicos, en cuanto a la relación entre exposición-efectos (Cuadro 2). Estos biomarcadores se eligieron de acuerdo a los contaminantes presentes en el sitio de estudio y a las especies evaluadas durante la primera fase del proyecto.

Cuadro 2.- Biomarcadores de efecto seleccionados

Biomarcador	Prueba	Contaminantes	Importancia biológica
Genotoxicidad	Ensayo cometa	DDT, HAPs	Integridad genética, alteraciones en los mecanismos de reparación y muerte celular
	Micronúcleos	Lindano, Plomo, HAPs	Inducción de cáncer, muerte celular, decremento en el potencial de sobrevivencia del organismo
Disrupción endocrina	Vitelogenina (VTG)	DDT, DDE, PCB's	Estrés metabólico, mortalidad, decremento en el éxito reproductivo y reclutamiento de la población
Hematotoxicidad	Alteraciones hematológicas (Hemoglobina, hematocrito)	Lindano, BTX	Estado general de salud del individuo, inmunosupresión y anemia
Biomarcadores bioquímicos	Ácido delta-aminolevulínico (ALA-D)	Plomo	Esta enzima actúa directamente en la síntesis del grupo hemo

Factores de incertidumbre

La evaluación del riesgo ecológico esta generalmente limitada por la incertidumbre respecto a los datos relevantes recabados durante el estudio. Esta se define como el componente del riesgo que resulta de una falta de conocimiento del grado de peligrosidad o de su patrón de expresión espacial o temporal (EPA, 2001). Por lo general, en la evaluación del riesgo para minimizar la incertidumbre se realizan estimaciones con base en los datos recolectados o suposiciones basadas en el juicio profesional del evaluador. Debido a estas estimaciones y supuestos los resultados al calcular el riesgo son inciertos, por lo que es importante que un evaluador profesional mencione las incertidumbres de su trabajo, con la finalidad de que sus resultados sean tomados con cautela por el público en general y sobre todo por los tomadores de decisiones. En el Cuadro 3 se presentan las principales incertidumbres de este estudio y que se pudo haber hecho para minimizarlas.

De acuerdo con la EPA, (2001) existen cuatro grupos primordiales de incertidumbres: 1) ambientales; 2) exposición; 3) toxicidad y 4) caracterización del riesgo. A continuación se



muestran las principales incertidumbres en una evaluación de riesgo ecológico, éstas incertidumbres están presentes en este trabajo:

Representatividad de las muestras recolectadas.- Las concentraciones de contaminantes en los diferentes componentes ambientales (suelo, sedimento, aire, agua) pueden variar respecto al espacio y al tiempo.

Presición de los resultados analíticos.- Generalmente la incertidumbre en el análisis de las muestras es baja; sin embargo, siempre existe la posibilidad de que se presenten errores analíticos. Los valores de contaminación registrados entre mas cercanos estén de los límites de detección del equipo analítico se incrementará la incertidumbre.

Rutas de exposición no evaluadas.- Las principales rutas de exposición para fauna son alimento y aire. Generalmente, este tipo de incertidumbre es muy alto ya que resulta muy complejo evaluar todas las potenciales rutas para alguna especie en particular.

Contaminantes no determinados.- En un escenario tan complejo como Coatzacoalcos resulta muy complicado y costoso evaluar todos los contaminantes potencialmente presentes en el sitio de estudio. Con base en los antecedentes registrados en la literatura, se obtuvo un panorama general de los tipos de contaminantes presentes en Coatzacoalcos; sin embargo, se decidió evaluar Contaminantes Orgánicos Persistentes y Metales. La selección de los contaminantes se realizó con base en su toxicidad, su importancia en cuanto a compromisos ambientales adquiridos por México (país signatario del Convenio de Estocolmo) y la capacidad analítica del laboratorio de Toxicología Ambiental.

Certidumbre del análisis estadístico.- El análisis estadístico sirve para recabar, organizar, resumir y analizar datos, así como para sacar conclusiones válidas y tomar decisiones razonables basadas en tal análisis. Por lo tanto, resulta crucial elegir las pruebas estadísticas más adecuadas. La EPA (2001) recomienda utilizar un nivel de significación estadística del 95%. Si se aplican las pruebas adecuadas la incertidumbre del análisis es muy baja.

Factores de exposición en fauna silvestre (Tasas de ingesta).- Esta incertidumbre es alta debido a la variabilidad intrínseca de las especies presentes en un ecosistema. Un claro ejemplo, son las tasas de ingesta de alimento, suelo y sedimento (de manera accidental) de cada una de las especies. Éstas pueden variar temporal y espacialmente.



Biodisponibilidad de contaminantes.- La toxicidad de los contaminantes registrados en el sitio de estudio dependerá de la biodisponibilidad y la ingesta de los agentes tóxicos. Esta incertidumbre es alta en estudios realizados en campo, ya que, en primer lugar no se sabe a que contaminantes se encuentra expuesto el organismo; segundo la cantidad ingerida de contaminante(s) no es conocida; tercero no se sabe si el 100% de los contaminantes estará biodisponible para el organismo.

Ausencia de valores de referencia.- Cuando no existen Valores Tóxicos de Referencia (VTR) o Dosis de Referencia (DR) para la especie que se esta evaluando, es complicado determinar si las concentraciones de contaminantes registrados en sus tejidos (hepático, muscular, adiposo, sangre) representan un riesgo para su salud o si su presencia resultará necesariamente en un efecto nocivo.

Extrapolación de datos toxicológicos entre receptores.- Debido a la variabilidad interespecífica resulta complicado, predecir o extrapolar resultados entre diferentes especies o grupos taxonómicos.

Extrapolación de datos de toxicidad respecto a las dosis y a la duración de la exposición.- En el laboratorio se expone a los organismos a dosis conocidas de contaminantes y se establece la duración de la exposición (crónica o aguda). Sin embargo, cuando estos bioensayos se pretenden extrapolar a especies silvestres en su hábitat natural, generalmente se obtienen resultados diferentes a los de laboratorio. Generalmente la incertidumbre es alta.

Extrapolación de estudios de laboratorio a campo.- Cuando se obtienen resultados a partir de estudios realizados bajo condiciones de laboratorio, existe una gran incertidumbre al pretender extrapolar los resultados obtenidos a investigaciones realizadas en campo, donde existen muchas variables (físicas y biológicas) que pueden afectar a los organismos que se están evaluando.

Exposición a mezclas de contaminantes.- En un sitio que presenta una mezcla de contaminantes puede haber sinergismo entre diferentes sustancias y potenciar los efectos en los diferentes organismos que habitan en ese lugar; sin embargo, también se puede establecer un antagonismo entre químicos que atenúe o nulifique los efectos provocados por los contaminantes, si éste es el caso se podría sobreestimar el riesgo.

Estimación de efectos a nivel poblacional.- Como ya se mencionó la extrapolación de los efectos de un nivel de organización biológica inferior a uno superior en la mayoría de las



ocasiones presenta mucha incertidumbre, ya que están implícitos múltiples factores bióticos y abióticos, tales como; las características de historia de vida del receptor evaluado, así como de la magnitud y frecuencia del estrés químico al que se encuentre expuesto.

Cuadro 3.- Resumen de incertidumbres en la evaluación de riesgo ecológico en fauna terrestre de Coatzacoalcos, Veracruz.

Tipos de incertidumbre	Descripción de la incertidumbre	Magnitud del error			Minimizar la incertidumbre
		Alta	Moderada	Baja	
Ambiental	Representatividad de las muestras recolectadas		X		Realizar un monitoreo ambiental que abarque mayor área y aumentar el tamaño de muestra por sitio.
	Precisión de los resultados analíticos			X	La incertidumbre es baja debido a que para todos los análisis se utilizaron estándares de referencia.
Evaluación de la exposición	Rutas de exposición no evaluadas		X		Evaluar alimento, agua y aire.
	Contaminantes no determinados	X			Evaluar por lo menos otro grupo de agentes tóxicos como los hidrocarburos y/o COVs.
	Confianza del análisis estadístico			X	La incertidumbre es baja, ya que se utilizaron las pruebas estadísticas más adecuadas y se manejó un nivel de significancia de 95%.
	Factores de exposición en fauna silvestre (Tasas de ingesta)		X		Se podría determinar el contenido estomacal y evaluar los contaminantes presentes en este alimento.
	Biodisponibilidad de contaminantes			X	Esta incertidumbre resulta muy baja, ya que los agentes tóxicos se registraron en diferentes tejidos, por lo tanto están biodisponibles.
Evaluación de la Toxicidad	Ausencia de valores de referencia		X		Podrían establecerse bioensayos y/o determinar sitios de referencia. Sin embargo, resulta complicado encontrar un sitio adecuado y además se incrementaría el costo y la duración del proyecto.
	Extrapolación de datos toxicológicos entre receptores	X			Debido a que los receptores ecológicos evaluados en este trabajo pertenecen a grupos taxonómicos diferentes, la extrapolación entre ellos resulta muy aventurada.
	Extrapolación de datos de toxicidad respecto a las dosis y a la duración de la exposición	No Aplica*			
	Extrapolación de estudios de laboratorio a campo	No Aplica*			
Caracterización del riesgo	Exposición a mezclas de contaminantes	X			Debido a la presencia de diferentes contaminantes es muy complejo establecer causalidad contaminante-efecto. Sin embargo, se podría utilizar un grupo de biomarcadores de efecto más amplio y que sean más específicos.
	Estimación de efectos a nivel poblacional	X			A menos que se utilice un biomarcador específico (ej. fragmentación del ADN en células germinales o vitelogenina), este tipo de incertidumbre siempre será alta, principalmente en escenarios tan complejos como Coatzacoalcos.

* En este estudio no existe este tipo de incertidumbre porque no se realizó esta actividad, sin embargo se considera importante mencionarlas para que se tomen en cuenta en estudios posteriores.



REFERENCIAS

- Blake, A. 2005. *The next generation of POP's: PBDE's and Lindane*. International POP's Elimination Network (IPEN). Washington D.C. USA. 15 p.
- Bravo, H., Sosa, R., Torres, R. 1992. La calidad del aire en la conurbación industrial de Coatzacoalcos-Minatitlán, Cap. VI: 17-145. In: Restrepo, I. (Ed) 1992. *La Contaminación atmosférica en México. Sus causas y sus efectos en la Salud*. México, D.F. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México.
- EPA, 2001. Risk Assessment Guidance for Superfund: Volume III - Part A, Process for Conducting Probabilistic Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. 398 p.
- González-Mille, D. 2006. *Riesgo ecológico en la zona minera de Villa de la Paz, San Luis Potosí*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 95 p.
- <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> (última visita mayo de 2009)
- <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm> (última visita mayo de 2009)
- Odum, E. 1971. Ecología. 3ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 639 p.
- Petrlink, J. y DiGangi, J. 2005. *The egg report*. International POP's Elimination Network (IPEN). Washington D.C. USA. 52p.
- Price, M.V. 1978. The role of microhabitat in structuring desert rodent communities. *Ecology*, 59: 910-921
- RAPAM. S/A. *Contamination of chicken eggs near the Pajaritos Petrochemical Complex in Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico by dioxins, PCBs and hexachlorobenzene*. Red de Acción Sobre Plaguicidas y Alternativas en México. International POPs Elimination Network (IPEN). http://www.ipen.org/ipepweb1/library/ipep_pdf_reports/5mex%20mexico_eggsreport.pdf (última visita febrero de 2009)
- Riojas-Rodriguez H.; Baltazar-Reyes, M.C. y Meneses, F. 2008. Volatile organic compound presence in environmental samples near a petrochemical complex in Mexico. *Abstracts Epidemiology*. 19(1): S219.
- Rosenweig, M.L. 1973. Habitat selection experiments with a pair of coexisting heteromyid species. *Ecology*, 54: 111-117



- Rosales, L. y Carranza, E. 2005. Estudio geoquímico de metales en el estuario del río Coatzacoalcos. In: *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnostico y Tendencias*. Eds. Vázquez-Botello, A.; Rendón-Von Osten, J.; Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 389-406.
- Stringer, R.; I. Labunska; K. Bridgen. 2001. *Organochlorine and heavy metals contaminants in the environment around the Complejo Petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, México*. Nota técnica Greenpeace. University of Exeter. Unit Kingdom. 60 p.
- Van den Brink, P.J.; Sibley, P.K.; Ratte, H.T.; Baird, D.J.; Nabholz, J.V.; Sanderson, H. 2008. Extrapolation of effects measures across levels of biological organization in ecological risk assessment. 105-133 pp. En: *Extrapolation practice for ecotoxicological effect characterization of chemicals*. Editado por: Solomon, K.; Brock, T.C.M.; Zwart, D.; Phostuma, L.; Richards, S.M.; Sanderson, H.; Sibley, P.K.; van den Brink, P.J. SETAC Press. Pensacola, Florida, USA. 380 p.
- Vázquez-Botello, A.; S. Villanueva-Fragoso; L. Rosales-Hoz. 2004. *Distribución y contaminación por metales en el Golfo de México*. pp. 682-712. En: *Diagnostico ambiental del Golfo de México*. Compiladores: Caso, M. I. Pisanty; E. Ezcurra. Editado por: SEMARNAT-INE.



CONCLUSIONES GENERALES



Villa de la Paz, San Luis Potosí

Los contaminantes en el suelo (As, Cd, Pb) de Villa de la Paz se encuentran biodisponibles, ya que se registraron en tejidos (hígado y riñón) de roedores nativos. Las concentraciones de metales cuantificadas en los tejidos de los roedores del sitio contaminado son mayores comparadas con las de los roedores del sitio de referencia.

Se registró mayor fragmentación del ADN en los roedores del sitio contaminado comparados con los roedores del sitio de referencia.

No se encontraron diferencias en cuanto a los parámetros morfométricos (longitud total, longitud de la cola, longitud de la pata trasera, longitud de la oreja) y el peso de los roedores de ambos sitios. Los roedores del sitio contaminado no presentaron malformaciones ni ectoparásitos. La proporción de sexos es similar a los resultados registrados por otros autores para las mismas especies.

Se postula el uso de *Dipodomys merriami* como una especie que funcione como biomonitor en sitios mineros similares a Villa de la Paz, debido a las siguientes características: amplia distribución geográfica; nichos ecológicos pequeños; alto potencial de exposición, dieta y fisiología (agua metabólica); antecedentes ecotoxicológicos; tiempo de vida corto (3 a 5 años); fácil captura y no está incluido en el PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008.

Se propone utilizar la simulación Monte Carlo para estimar la exposición a arsénico en niños y roedores (*D. merriami*) a través de la ingesta accidental de suelo. Lo anterior nos daría la ventaja de que, ya no sería necesario obtener muestras biológicas de los niños (orina) y no se sacrificarían roedores para la cuantificación de As en sus tejidos. Además, también se puede inferir el efecto (genotoxicidad) en ambos receptores. En otras palabras, una vez conocidas las concentraciones totales de As en suelo podríamos estimar la exposición y el efecto.

La diversidad de la comunidad de roedores del sitio de referencia es mayor con respecto a la del sitio contaminado, esto significa un efecto de relevancia ecológica muy alta. Sin embargo, la pérdida de diversidad biológica no se puede atribuir completamente a la contaminación que existe en el sitio, ya que también influyen otras actividades antropógenas como por ejemplo el cambio de uso de suelo, la apertura de caminos, la ganadería y principalmente la urbanización que se está llevando a cabo actualmente en esta región. Así como otros aspectos ecológicos como la estructura vegetal, abundancia de alimento, disposición de refugios, etc.



La integración de los resultados obtenidos se realizó mediante biomarcadores de efecto a diferentes niveles de organización biológica, sin embargo, no fue posible establecer causalidad entre el efecto registrado a nivel molecular (fragmentación del ADN) con el efecto a nivel comunidad (pérdida de diversidad). Lo anterior se debe a que en la mayoría de los sitios contaminados existen una mezcla de contaminantes, por lo que rara vez los efectos biológicos registrados en los receptores se pueden atribuir a un solo tipo de contaminantes, de manera tal, que determinar o establecer una relación causal entre algún contaminante y los efectos observados no es posible debido a la complejidad intrínseca de los estudios en campo y la variabilidad en las respuestas biológicas.

Coatzacoalcos, Veracruz

Los resultados obtenidos indican que en la región de Coatzacoalcos existe contaminación por Contaminantes Orgánicos Persistentes y Plomo en suelo. Además, se demostró que estos contaminantes se encuentran en plasma y tejidos de iguanas y cangrejos (biodisponibilidad).

Las concentraciones de Lindano, HCB y PCBs en suelo de los sitios analizados superan las guías internacionales por lo que implica un riesgo a la salud de los diferentes receptores biológicos. Con base en los resultados obtenidos no fue posible establecer zonas de mayor o menor exposición a α -HCH, β -HCH, Lindano, DDE y DDT, ni un gradiente de concentración, por lo que nuestra hipótesis no se cumplió. Con base en lo anterior, el área de Coatzacoalcos debe ser considerada como una zona generalizada de exposición a estos contaminantes. Se recomienda incrementar el área de estudio aguas arriba del Río Coatzacoalcos y tomar como probables sitio de referencia un sitio aguas arriba del Río Uxpanapa, en donde no existe actividad industrial aparente.

Las iguanas fueron las especies que presentaron las concentraciones más altas de α , β HCHs y lindano. Las mayores concentraciones de COPs (ng/g de tejido), se registraron en el tejido adiposo seguido del hepático y por último el tejido muscular. En las muestras compuestas de cangrejos también se registraron concentraciones de COPs. En los roedores y las lombrices no pudo ser realizada la evaluación de la exposición a COPs ya que no se contó con un tamaño de muestra suficiente para el análisis.



A pesar de que la iguana se encuentra protegida, se sabe que su carne es una de las principales fuentes de alimento de los pobladores que habitan en comunidades rurales del sur de México, lo anterior podría significar una ruta de exposición muy importante semejante al consumo de jaibas y algunas especies de peces.

En cuanto a la fragmentación del ADN en las lombrices de tierra se encontró que los organismos capturados en Coatzacoalcos presentaron mayor daño ($p < 0.05$) comparado con las lombrices de laboratorio. La fragmentación del ADN es una evidencia del estrés ambiental al que están siendo sometidos algunos receptores ecológicos en la zona industrial de Coatzacoalcos. Finalmente, postulamos a la lombriz de tierra como un excelente organismo biomonitor debido a las siguientes características: distribución amplia, antecedentes ecotoxicológicos, ciclo de vida corto, no se mueven grandes distancias, son fáciles de capturar y manejar y se encuentran en contacto directo con una de las matrices receptoras o acumuladoras de diferentes tóxicos ambientales (suelo).

Utilizando la metodología de evaluación integrada de riesgo se ha logrado obtener líneas de evidencia sólidas del estrés ambiental (contaminantes en matrices ambientales, biodisponibilidad de los mismos y fragmentación del ADN) en el que se encuentran algunas especies de fauna silvestre (roedores, lombrices, iguanas) en dos sitios con características completamente diferentes en cuanto a factores bióticos y abióticos, así como tipo de contaminantes presentes en cada uno de estos sitios. La aplicación de la evaluación integrada del riesgo resultó menos complicada en el sitio minero de Villa de la Paz, debido en gran medida a que en este sitio se registró la presencia de un grupo de contaminantes (metales). Mientras que en el sitio industrial de Coatzacoalcos, no solo se registraron contaminantes de origen industrial, sino que además existe una aportación considerable de descargas urbanas, no solo de Coatzacoalcos, sino también de otros municipios como, Hidalgotitlán, Minatitlán, Nanchital, e Ixhuatlán que se ubican a lo largo de la ribera del Río Coatzacoalcos. En esta región se han registrado diferentes grupos de contaminantes (metales, COPs, HTPs, HAPs, COVs, compuestos bromados, dioxinas, monómero de cloruro de vinilo, HCHs, etc.) los cuales forman mezclas complejas, lo que dificulta el análisis e interpretación de los resultados.

Finalmente, debido a la flexibilidad con la que ha sido diseñada esta metodología se considera que si es factible aplicarla en diferentes sitios contaminados. Sin embargo, durante la



realización del presente trabajo se detectaron algunas limitantes que complicaron su aplicación adecuada en sitios complejos como Coatzacoalcos. La principal limitante resulto ser la capacidad analítica tanto de matrices ambientales como biológicas, debido a que no se contó con las metodologías analíticas para la cuantificación de algunos compuestos como HAPs, HTPs, dioxinas y monómero de cloruro de vinilo de los cuales se sabe que existen en la zona. Así como, la cantidad de muestra (tejido) para la detección de los contaminantes; aunado al costo elevado asociado al análisis de las muestras. De manera alterna, se sugiere establecer una batería de biomarcadores más amplia, con la finalidad de recabar líneas de evidencia que permitan establecer el nivel de afectación en diversos receptores ecológicos en sitios contaminados.



GLOSARIO

Este glosario fue tomado de la **Guía técnica para orientar la elaboración de estudios de evaluación de riesgo ambiental de sitios contaminados**, publicada en diciembre del 2006 por la SEMARNAT-DGGIMAR.

Bioensayo de toxicidad: Prueba para establecer la magnitud y la naturaleza del efecto que producirá un agente químico sobre organismos expuestos a él, bajo condiciones específicas.

Nota aclaratoria: En el área de la ecotoxicología, los agentes incluyen muestras ambientales de agua, suelo o sedimentos, efluentes domésticos e industriales, extractos de sedimentos o suelos contaminados, etc.

Nota aclaratoria: Un bioensayo de toxicidad evalúa la porción de organismos afectados (resultado cuantitativo) o el grado de efecto (resultado cualitativo) después de la exposición a niveles específicos de un estímulo (concentración o dosis de un químico o mezcla de químicos).

Término relacionado: Prueba de toxicidad.

Bioensayo agudo: Pruebas cortas, en relación con el tiempo generacional de los organismos, y generalmente a altas concentraciones de exposición.

Bioensayo crónico: Pruebas con tiempos mayores de exposición a un agente estresante y concentraciones generalmente bajas. El tiempo de exposición corresponde al menos de una décima parte del tiempo de vida de los organismos en estudio y las respuestas corresponden por ejemplo a cambios en el metabolismo, crecimiento, reproducción, habilidad para sobrevivir.

Bioensayo subcrónico: Pruebas de corta exposición que son indicativas de efectos a tiempos de exposición mayores, generalmente dirigidas a organismos con estadios de vida críticos o sensibles. El tiempo de exposición generalmente no excede el 10 % del tiempo de vida de los organismos.

Bioacumulación: Concentración resultante acumulada en el medio ambiente o en los tejidos de organismos a partir de la incorporación, distribución y eliminación de contaminantes obtenidos por todas las rutas de exposición por ejemplo por aire, agua, suelo, sedimento y alimento.

Nota aclaratoria: La acumulación se da debido a su persistencia, la baja o nula alteración por el metabolismo del organismo y/o diversas características fisicoquímicas del contaminante.

Bioaccesibilidad: Fracción soluble de un elemento químico contenido en el suelo determinado a partir de un estudio *in vitro*.

Biodisponibilidad: Característica de las sustancias tóxicas que indica la facilidad de incorporarse a los seres vivos mediante procesos o mecanismos, inhalación, ingesta o absorción, y que están influenciados por diferentes parámetros como, las rutas de exposición, las características fisiológicas del receptor y las características químicas del xenobiótico.

Nota aclaratoria: se puede interpretar como la fracción soluble de un elemento potencialmente tóxico que puede atravesar barreras biológicas de intercambio del organismo receptor.

Biodiversidad: La variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otros, los ecosistemas terrestres, marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas.



Biomarcador: Es un indicador bioquímico, fisiológico o ecológico del estrés físico, químico o biológico en los organismos y sus poblaciones. Es un trazador de las reacciones que pueden ocurrir a diferentes niveles –molecular, celular, en el organismo completo, las poblaciones o comunidades. Su detección permite evaluar de forma temprana los efectos negativos de los contaminantes.

Nota aclaratoria: Se utilizan para: (1) detectar la presencia de una exposición; (2) determinar las consecuencias biológicas de la exposición; (3) detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico; (4) identificar a los individuos sensibles de una población; y (5) fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Biomarcadores de exposición: Respuestas biológicas que integran las propiedades fisicoquímicas del compuesto tóxico y su toxicocinética en el organismo; es decir, reflejan que el organismo está o ha estado expuesto a contaminantes particulares dando cuenta de su biodisponibilidad.

Biomarcadores de efecto: Respuestas moleculares, bioquímicas, celulares o fisiológicas de un organismo y que son indicativas del efecto tóxico de los contaminantes. Algunos de estos biomarcadores señalan solamente el estado de un proceso que puede ser o no reversible, dependiendo de la duración e intensidad de la exposición.

Cálculo de riesgo: Cuantificación de la probabilidad de que ocurran efectos adversos específicos en un organismo, sistema o población por la exposición actual o futura a un contaminante.

Nota aclaratoria: Esto incluye la magnitud, escala espacial, duración e intensidad de las consecuencias adversas y sus probabilidades asociadas como una descripción de la relación entre causa-efecto.

Caracterización de riesgo: Es la integración de la evidencia, razonamientos y conclusiones recolectados durante la identificación de peligro, evaluación de dosis-respuesta y la evaluación de exposición; el cálculo de la probabilidad, incluyendo las incertidumbres de ocurrencia y efectos adversos cuando se administra, toma o absorbe un agente en un organismo o población. Es el último paso de la evaluación de riesgo.

Caracterización de sitios contaminados: Es la determinación cualitativa y cuantitativa de los contaminantes químicos o biológicos presentes, provenientes de materiales o residuos peligrosos, para estimar la magnitud y tipo de riesgos que conlleva dicha contaminación.

Componente ecológico: Cualquier parte del sistema ecológico incluyendo individuos, poblaciones, comunidades, sus interacciones, relaciones y al mismo ecosistema.

Comunidad: Grupo de poblaciones de diferentes especies que interaccionan entre sí y que habitan en una misma área.

Concentración: La relación de una sustancia disuelta o contenida en una cantidad dada de otra sustancia.

Concentración de fondo total: Masa del elemento químico regulado por unidad de masa del suelo en estudio, expresada en términos del Sistema General de Unidades de Medida, que se encuentra en un suelo de manera natural.

Contaminación: La presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico.

Contaminante: Toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

Contaminante crítico: Contaminante elegido por su abundancia, toxicidad y peligrosidad para realizar la caracterización del riesgo.



Definición y formulación del problema: Proceso para generar y evaluar la hipótesis preliminar acerca del porque de los efectos a la(s) población(s), los recursos naturales y/o ecosistemas ocurridos o que pudieran ocurrir a causa de la contaminación del sitio. Provee el fundamento para el estudio de evaluación de riesgo ambiental y donde se elabora el escenario inicial de trabajo, el plan de caracterización, muestreo y que incluyen los objetivos y alcances del estudio.

Dérmico(a): Relativo a la piel. La absorción dérmica significa absorción de algún elemento a través de la piel.

Dosis: Cantidad de una sustancia disponible que interactúa con el proceso metabólico o biológico de los receptores una vez que ha cruzado las barreras externas del organismo.

Dosis suministrada: Cantidad o concentración del agente químico o físico que está presente en la superficie de contacto durante un período especificado y que se expresa por unidad de masa corporal del individuo expuesto.

Dosis de exposición (DE): Cantidad de sustancia a la que se expone el organismo y el tiempo durante el que estuvo expuesto. La dosis de exposición determina el tipo y magnitud de la respuesta biológica.

Dosis de referencia (DdR): Es el índice de toxicidad que más se utiliza en la evaluación de riesgos por exposición a sustancias no-cancerígenas. Es el nivel de exposición diaria que no produce un riesgo apreciable de daño en poblaciones humanas, incluyendo las subpoblaciones sensibles.

Ecosistema: La unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de éstos con el ambiente, en un espacio y tiempo determinados.

Efectos: Consecuencia por virtud de una causa.

Efecto adverso o daño: Cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, o reproducción de un organismo, población, comunidad o ecosistema que resulta en el deterioro de la capacidad funcional y deterioro en la capacidad de compensar los efectos de factores de estrés adicionales. Es una función de la dosis de exposición y, de las condiciones de exposición (vía de ingreso, duración y frecuencia de las exposiciones, tasa de contacto con el medio contaminado, entre otros).

Efecto tóxico o respuesta tóxica: Cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición a sustancias tóxicas. Sólo se consideran como desviaciones significativas los cambios irreversibles o los cambios que permanecen por un período prolongado después de que la exposición ha cesado. El tipo de efecto tóxico que produce una sustancia sirve para hacer una clasificación general de los tóxicos en: (1) cancerígenos; (2) no-cancerígenos; y (3) tóxicos para el desarrollo.

Endocrino: Perteneciente a hormonas o glándulas que secretan hormonas directamente en el torrente sanguíneo.

Escenario de exposición: Conjunto de suposiciones que describen cómo ocurren las exposiciones, incluyendo las características del agente estresante.

Especie crítica: Especie con interés ecológico o económico, o que es clasificada con algún estatus de protección por la legislación mexicana y por lo tanto se requiere conocer su vulnerabilidad a los efectos de un contaminante y es elegida para realizar el estudio de riesgo ambiental. Término relacionado: especie de interés especial u organismo blanco.

Especie receptora: Especie crítica que recibe o está en contacto con los contaminantes.

Especies y poblaciones en riesgo: Aquellas identificadas por la SEMARNAT como probablemente extintas en el medio silvestre, en peligro de extinción, amenazadas o sujetas a protección especial, con arreglo a esta Ley.



Evaluación de efectos: Análisis e inferencia de las posibles consecuencias en un organismo blanco específico, población o ecosistema, por la exposición a un factor en particular y basado en el conocimiento de la relación causa-efecto.

Evaluación de exposición: Medición o estimación de la dosis o concentración de exposición incluyendo la calificación de las incertidumbres.

Evaluación de la toxicidad: Selección de los valores adecuados de los parámetros que miden la peligrosidad de las sustancias tóxicas presentes en el sitio, acompañados por la calificación de la calidad de esa información. El parámetro que se usa en evaluación de riesgos es el índice de toxicidad.

Evaluación del Riesgo Ambiental: Proceso metodológico para determinar la probabilidad o posibilidad de que se produzcan efectos adversos, como consecuencia de la exposición de los seres vivos a las sustancias contenidas en los residuos peligrosos o agentes infecciosos que los forman.

Exposición: Co-ocurrencia del contacto entre el agente estresante y el componente ecológico.

Factor de incertidumbre: Factor aplicado a una concentración de exposición o a una concentración o dosis de efecto para corregirlo por una fuente de incertidumbre identificada.

Fuente de contaminación: Punto o área de contaminación y dispersión de materiales peligrosos y residuos peligrosos al ambiente, fuente que emite contaminantes al medio ambiente en un sitio contaminado.

Fuente no específica: Actividades que generan una contaminación difusa (no puntual) de materiales peligrosos o residuos peligrosos al medio ambiente y que pueden aplicarse a diferentes actividades o procesos.

Hábitat: El sitio específico en un medio ambiente físico, ocupado por un organismo, por una población, por una especie o por comunidades de especies en un tiempo determinado.

Nota aclaratoria: Espacio que reúne las condiciones adecuadas para que habite una población o especie (animal, planta, bacteria).

Incertidumbre: Conocimiento imperfecto relacionado con el estado presente y futuro de un sistema en consideración. Componente del riesgo que resulta de un conocimiento imperfecto del grado de peligrosidad o de su patrón de expresión espacial o temporal.

Índice de peligro: Es la relación entre la concentración de exposición y un valor de referencia.

Ingestión: Tragar (como cuando se come o se bebe). Las sustancias químicas pueden ser ingeridas en el alimento, la bebida, utensilios, manos, suelo). Luego de la ingestión, las sustancias químicas pueden ser absorbidas en la sangre y distribuidas en todas partes del cuerpo.

Inhalación: Respiración. La exposición puede ocurrir por inhalación de los contaminantes, porque éstos se pueden depositar en los pulmones, transportarse en la sangre o ambos.

Límite máximo de exposición: Cuando la exposición aunque puede representar un riesgo para la población, es todavía socialmente aceptable.

Liberación de residuos peligrosos: acción de descargar, inyectar, inocular, depositar, derramar, emitir, vaciar, arrojar, colocar, rociar, abandonar, escurrir, gotear, escapar, enterrar, tirar o verter residuos peligrosos en los elementos naturales.

Límite de tolerancia: Concentración de exposición o dosis de exposición de un contaminante debajo del cual se espera que no se exista efecto.

Término relacionado: umbral

Material peligroso: Elementos, sustancias, compuestos, residuos o mezclas de ellos que, independientemente de su estado físico, represente un riesgo para el ambiente, la salud o los



recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas.

Matriz ambiental: Elemento de un ecosistema en donde pueda estar incidiendo un contaminante después de su emisión. Puede ser el agua (de un río, laguna, estero o mar), el sedimento, el suelo o el aire.

Marcador biológico: Parámetro que se puede usar para identificar un efecto tóxico en un organismo y también en la extrapolación entre especies o como un indicador que señala un evento o condición en un sistema biológico o muestra y proporciona una medida de la exposición, efecto o sensibilidad. Sinónimo de Biomarcador.

Mecanismo de acción tóxica: Proceso por el cual el efecto de un tóxico es inducido. Por ejemplo: narcosis aguda, inhibición de la enzima acetil colinesterasa.

Mecanismo de transporte: Proceso físico mediante el cual los contaminantes migran hacia un medio ambiente y de él hacia otro medio.

Medidas para reducir la exposición: Acciones de remediación en las cuales no se produce una eliminación de los contaminantes del sitio, solamente se interrumpen a través de obras de ingeniería las rutas y vías de exposición. Ejemplos de dichas medidas son: construcción de coberturas superficiales de apilamiento de residuos, canales, diques de contención, cercas, confinamientos y rellenos controlados.

Medios ambientales: Cualquier elemento natural (suelo, el agua, el aire, las plantas, los animales o cualquier otra parte del medio ambiente) que participa en los flujos de materia y energía en el sistema y que puede contener contaminantes. También referidos como compartimientos ó componentes.

Modelo conceptual: Herramienta que representa esquemática o descriptivamente un evento de contaminación en un sistema ambiental. Es utilizado para determinar los procesos físicos, químicos y biológicos que dan lugar al transporte de contaminantes desde la fuente hacia los medios ambientales y de ahí a los potenciales receptores del sistema, así como para determinar el grado de contaminación de un sitio.

Modelo determinístico: Modelo matemático donde todo es especificado y donde no se incluye un componente estocástico.

Monitoreo ambiental: Conjunto de acciones para la verificación periódica del grado de cumplimiento de los requerimientos establecidos para evitar la contaminación del ambiente.

Morbilidad: Enfermedad. La tasa de morbilidad es el número de enfermedades o casos de enfermedad en una población.

Muestreo biológico o dosimetría interna: Determinación cuantitativa de la concentración del tóxico o sus metabolitos en uno o más medios corporales del organismo expuesto. Se usa para estimar la exposición que experimentan cada uno de los tejidos del cuerpo, con el fin de estimar la magnitud de la exposición ambiental y para demostrar que existió una exposición efectiva. El simple hecho de que el tóxico se encuentre dentro del organismo es la prueba de que existió la exposición.

Nivel de referencia: Concentración o dosis de un químico que esta en el umbral de toxicidad o de contaminación significativa.

Organismo: Individuo; en el caso de organismos multicelulares se refiere a individuos formados por un sistema de órganos.

Organismo blanco: Especie crítica con valor económico o ecológico que se elige para su estudio. *Nota aclaratoria:* Se refiere a una especie crítica elegida para estudio.



Organismos y/o poblaciones no humanas: En evaluación integral de riesgos se refiere a todos los seres vivos, sean plantas, animales superiores o microorganismos. Estos son denominados biota en las ciencias biológicas.

Peligro: Capacidad inherente de un (o varios) agente (s) de estrés de causar efecto(s) adverso(s) cuando el hombre, sistemas o poblaciones están expuestos a él.

Población potencialmente expuesta: Grupos de individuos de la misma especie situados en el mismo tiempo y espacio en la proximidad o dentro de un sitio contaminado, que pueden entrar en contacto con sustancias o compuestos de origen antropogénico presentes en el medio ambiente, susceptibles de ocasionar efectos adversos en la salud.

Pasivo Ambiental: Se considera a aquellos sitios contaminados por la liberación de materiales o residuos peligrosos, que no fueron remediados oportunamente para impedir la dispersión de contaminantes, pero que implican una obligación de remediación. En esta definición se incluye la contaminación generada por una emergencia que tenga efectos a largo plazo sobre el medio ambiente.

Perfil toxicológico: Conjunto de informaciones toxicológicas de una sustancia a partir de estudios de laboratorio o campo por medio de los cuales se generaron los parámetros de toxicidad característicos de dicha sustancia.

Población receptora: Poblaciones (humanas o biota) que están expuestas a los contaminantes, la población receptora es entonces la población expuesta.

Puntos de exposición: Son los sitios en donde sucede el contacto de los organismos con los contaminantes.

Receptor: Organismo, población o comunidad que esta expuesta a contaminantes.

Relevancia ecológica: Respuestas que reflejan características importantes de altos niveles de organización biológica (por ejemplo poblaciones, comunidades, ecosistemas). Término que se emplea para respuestas que sugieren el estado (en estructura y función) de poblaciones, comunidades y ecosistemas.

Relación causa-efecto: Relación entre la cantidad de un agente administrado, incorporado o adsorbido por un organismo, población o ecosistema y el cambio desarrollado en tal organismo, población o ecosistema a causa del agente. Términos relacionados: relación dosis-efecto, relación dosis-respuesta, relación concentración-efecto, evaluación de efecto.

Respuestas con relevancia ecológica respuestas que indican el estado que guardan poblaciones, comunidades y ecosistemas en cuanto a su estructura y su función.

Remediación: Conjunto de medidas a las que se someten los sitios contaminados para eliminar o reducir los contaminantes hasta un nivel seguro para la salud y el ambiente o prevenir su dispersión en el ambiente sin modificarlos, de conformidad con lo que se establece en esta Ley.

Residuo: Material o producto cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentra en estado sólido o semisólido, o es un líquido o gas contenido en recipientes o depósitos, y que puede ser susceptible de ser valorizado o requiere sujetarse a tratamiento o disposición final conforme a lo dispuesto en esta Ley y demás ordenamientos que de ella deriven.

Residuos peligrosos: Todos aquellos residuos, en cualquier estado físico, que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente.

Riesgo: Probabilidad o posibilidad de que el manejo, la liberación al ambiente y la exposición a un material o residuo, ocasionen efectos adversos en la salud humana, en los demás organismos vivos, en el agua, aire, suelo, en los ecosistemas, o en los bienes y propiedades pertenecientes a los particulares.



Ruta de exposición: Trayectoria que sigue un tóxico desde la fuente de emisión hasta el contacto con las poblaciones previamente seleccionadas como potencialmente expuestas, incluyendo la vía de ingreso del tóxico a los organismos expuestos. (Fuente de contaminación, medio ambiente y mecanismos de transporte, punto de exposición, vía de exposición y presencia de la población receptora).

Sitio contaminado: Lugar, espacio, suelo, cuerpo de agua, instalación o cualquier combinación de éstos que ha sido contaminado con materiales o residuos que, por sus cantidades y características, pueden representar un riesgo para la salud humana, a los organismos vivos y el aprovechamiento de los bienes o propiedades de las personas.

Sub-organismo: Término que hace referencia a niveles de organización biológica por debajo del nivel de organismo. Por ejemplo, bioquímico, molecular.

Supra-organismo: Término que hace referencia a niveles de organización biológica por arriba del nivel de organismo. Por ejemplo, población, comunidades.

Surrogado: Un organismo o población de prueba que son cultivados en condiciones de laboratorio y que sirven como sustitutos de organismos, poblaciones o comunidades locales en pruebas de toxicidad.

Toxicidad.- La propiedad de una sustancia o mezcla de sustancias de provocar efectos adversos en la salud o en los ecosistemas.

Toxicidad aguda.- El grado en el cual una sustancia o mezcla de sustancias puede provocar, en un corto periodo de tiempo o en una sola exposición, daños o la muerte de un organismo.

Nota aclaratoria: Tiempo corto respecto al tiempo generacional de los organismos.

Toxicidad crónica.- Es la propiedad de una sustancia o mezcla de sustancias de causar efectos dañinos a largo plazo en los organismos, generalmente a partir de exposiciones continuas o repetidas y que son capaces de producir efectos cancerígenos, teratogénicos o mutagénicos.

Toxicidad subletal: Capacidad de un agente de causar efectos a concentraciones por debajo de las que causan la muerte (concentraciones letales). Los efectos pueden ser a nivel conductual, bioquímico, fisiológico o histológico.

Toxicocinética: Proceso que incluye la incorporación de compuestos tóxicos al cuerpo del organismo receptor, la biotransformación, la distribución de él y de sus metabolitos en el tejido y su eliminación (del tóxico inicial y de los metabolitos) del cuerpo del organismo receptor.

Toxicodinamia: Proceso de interacción de compuestos tóxicos con sitios blancos (se refiere a sitios para comparación) y las consecuencias bioquímicas y fisiológicas que causan un efecto adverso.

Vía de exposición: Proceso por el cual el contaminante entra en contacto directo con el cuerpo, tejidos o barreras de intercambio del organismo receptor, por ejemplo, ingestión, inhalación y absorción dérmica.

Vida silvestre: Los organismos que subsisten sujetos a los procesos de evolución natural y que se desarrollan libremente en su hábitat, incluyendo sus poblaciones menores e individuos que se encuentran bajo el control del hombre, así como los naturales.



ANEXO I.- SELECCIÓN DE GRUPOS ANIMALES

Dentro de los grupos animales en los que se realizaron los estudios ecotoxicológicos, se trató de seleccionar especies críticas; es decir, especies que tienen un papel importante en la dinámica del ecosistema y/o importancia (económica, cultural, científica, etc.) para el hombre y que pudieran tener mayor vulnerabilidad a la contaminación del sitio en estudio. En el Cuadro 1 se presentan los Criterios de inclusión para seleccionar especies que funcionaron como biomonitores en sitios contaminados de México dentro del Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental (PRONAME), cuyo objetivo es “*definir y aplicar un enfoque regional sustentable de América del Norte para el monitoreo ambiental y de la exposición humana a sustancias químicas en el medio ambiente, incluido el biomonitoreo*”.

A continuación se presentan los criterios con los cuales se determinó cuál o cuáles serían las especies a evaluar:

- Tipo de **contaminante(s)** presentes en el sitio. En la mayoría de los sitios contaminados existen mezclas de contaminantes. Por lo que se debe conocer la toxicocinética (la velocidad de cambio de la concentración de las sustancias tóxicas dentro del organismo), además de la toxicodinamia (dónde y cómo se lleva a cabo el efecto del tóxico dentro del organismo) de los contaminantes, tanto la toxicocinética como la toxicodinamia de los compuestos tóxicos se determinaron con base en literatura. No es imperativo realizar un monitoreo ambiental en las diferentes matrices (suelo, agua, aire) para identificar los contaminantes, ya que es posible obtener esta información consultando literatura especializada, sin embargo, en caso de no existir antecedentes, será necesario generar información al respecto.
- Las probables rutas de exposición (ingesta, inhalación y dérmica) que dependerán del comportamiento ambiental de los contaminantes. Una vez determinados los contaminantes y las probables rutas de exposición, es posible determinar qué especies son las más expuestas.
- Seleccionar las especies de biología bien conocida (dieta, nicho ecológico, amplitud de hábitat, época reproductiva y hábitos de conducta), esto se puede determinar con base en literatura. Se recomienda realizar un muestreo poblacional preliminar para establecer si las



especies propuestas son abundantes, de lo contrario será necesario seleccionar otras especies.

- Las especies seleccionadas deben ser relativamente de fácil captura y manejo (insectos, anélidos, crustáceos, peces, roedores, anfibios).
- Realizar un análisis documental básico de los componentes de la red trófica que existen en el sitio de estudio, con la finalidad de seleccionar especies preferentemente ubicadas en diferentes niveles de la red trófica, para lograr una mejor caracterización de la magnitud del impacto ecológico y su posible afectación a la población humana.



Cuadro 1.- Criterios de inclusión para seleccionar especies que funcionarán como biomonitores en sitios contaminados de México.

Distribución		
Restringida 1		Amplia 5
Identificación		
Difícil 1	Regular 3	Fácil 5
Captura		
Difícil 1	Regular 3	Fácil 5
Biología general		
Poco documentada 1	Medianamente documentada 3	Bien documentada 5
Nivel trófico		
Productor secundario 1	Consumidor primario 3	Consumidor secundario 5
PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008		
Si 1		No 5
Antecedentes Ecotoxicológicos		
Nada 1	Poco 3	Mucho 5
Área de actividad		
Amplia 1	Regular 3	Reducida 5
Talla		
Chica 1	Mediana 3	Grande 5
Importancia de la especie		
Económica Si No	Cultural Si No	Científica Si No
Carisma		
Nada 1	Poco 3	Mucho 5

Esta tabulación fue generada con la finalidad de seleccionar las especies que se van a utilizar en el Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental (PRONAME).



Matriz de ponderación de las especies propuestas para el Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental

Grupo taxonómico	Especie		Distribución	Fácil identificación	Fácil captura	Biología general	Nivel trófico	NOM-ECOL-059-2008	Antecedentes Ecotoxicológicos	Área de actividad	Talla	Carisma	Importancia de la especie **	Puntaje final
	Nombre común	Nombre científico												
Mamíferos	Armadillo	<i>Dasyus novemcinctus</i>	5	5	1	5	3	5	1	3	5	3	2	38
	Murciélago insectívoro	<i>Eptesicus fuscus</i>	3	3	3	1	3	5	1	1	1	1	2	24
	Murciélago insectívoro	<i>Tadarida brasiliensis</i>	5	5	1	3	5	5	1	1	1	1	2	30
	Rata algodonera	<i>Sigmodon sp.</i>	3	5	3	5	3	1*	3	5	3	1	2	34
	Rata magueyera	<i>Neotoma sp</i>	5	5	3	5	3	5	1	5	3	1	2	38
	Ratones de abazones	<i>Liomys - Heteromys - Perognathus</i>	3	3	3	5	1	5	1	5	3	1	2	32
	Tlacuache	<i>Didelphis virginiana</i>	5	5	1	5	3	5	1	3	5	1	2	36
Aves	Garza chapulinera	<i>Bubulcus ibis</i>	5	5	1	3	5	5	1	1	3	1	3	33
	Gorrion de ciudad	<i>Passer domesticus</i>	5	5	3	5	3	5	1	1	1	1	2	32
	Jilguero	<i>Myadestes sp.</i>	3	3	1	3	5	1	1	3	1	1	3	25
	Lechuza	<i>Tyto alba</i>	5	5	1	5	5	5	1	1	5	5	3	41
	Zanate	<i>Quiscalus mexicanus</i>	5	5	1	5	3	5	1	1	3	1	3	33
	Pato pichin	<i>Dendrocygna spp.</i>	5	5	1	5	5	5	3	1	5	1	3	39
	Zopilote	<i>Cathartes y Coragyps</i>	5	5	1	3	5	5	1	3	5	1	1	35
Reptiles	Cocodrilo	<i>Crocodylus sp.</i>	3	5	1	5	5	1	3	3	5	5	3	39
	Iguana	<i>Iguana y Ctenosaura</i>	5	5	1	5	3	1	3	5	5	5	3	41
	Lagartijas	<i>Sceloporus sp.</i>	5	1	3	5	3	1*	3	5	3	1	1	31
	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	5	5	3	5	5	1	3	3	3	5	3	41
	Vibora de cascabel	<i>Crotalus spp.</i>	5	3	3	5	5	1*	1	3	5	3	3	37
Anfibios	Sapo	<i>Bufo sp.</i>	5	3	5	5	5	5	3	3	5	1	3	43
Peces	Lisa	<i>Mugil curema y M. cephalus</i>	3	5	5	5	5	5	3	1	5	1	3	41
	Tilapia	<i>Oreochromis sp.</i>	5	3	5	5	5	5	3	1	5	1	3	41
	Bagre	<i>Ictalurus y Cathostomus</i>	5	1	5	3	3	5	3	1	5	1	3	35
Invertebrados	Bivalvos	<i>Mystella estrigata</i>												
	Hormigas	<i>Pogonomyrmex</i>	3	5	5	5	1	5	1	5	1	1	2	34



Grupo taxonómico	Especie	Distribución	Fácil identificación	Fácil captura	Biología general	Nivel trófico	NOM-ECOL-	Antecedentes Ecotoxicológicos	Área de actividad	Talla	Carisma	Importancia de la especie **	Puntaje final
	Lombrices <i>Eisenia y Lumbricus</i>	5	3	5	5	1	5	5	5	1	1	3	39
	jaibas <i>Callinectes sp.</i>	5	5	5	5	3	5	3	5	3	2	3	44
	ORGANISMO IDEAL	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	53

* Algunas especies de éste género si se encuentran en el PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008.

** Todas las especies fueron calificadas con la misma importancia científica.



ANEXO II.- METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS DE METALES Y COPs EN MATRICES BIOLÓGICAS

Metales

Procedimiento de digestión ácida de tejidos

Los ejemplares se sacrificarán e inmediatamente se extraerán los tejidos (hígado, riñones, cerebro) y se prefunden con buffer Tris pH 7.2. Los tejidos se pesaran y recibirán un tratamiento para eliminar la materia orgánica presente, esto se realizará colocando los tejidos en un vaso de precipitado, adicionando 3 mL de HNO₃ concentrado y 0.5 mL de HClO₄, se cubrirá con un vidrio de reloj (previamente etiquetado) y se colocaran sobre una placa de calentamiento a temperatura baja durante 15 minutos y después se aumentará la temperatura hasta alcanzar los 80° C dejando a reflujo la muestra. Al término de la digestión, se retirará el vidrio de reloj llevando la muestra a sequedad. El precipitado contenido en el vaso se resuspende en un volumen de 15 mL de HCl 3%, todo el procedimiento se realizará por duplicado. Como control de calidad se utilizará el estándar de referencia NBS-Bovine liver 1577a, obtenido de National Bureau of Standards (USA).

Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en tejidos

Recolecta de la muestra de tejido

Obtener la máxima cantidad de tejido (aproximadamente 10 g) y colocarlo en un frasco de vidrio color ámbar de boca ancha de 50 ml, al cual se le coloca papel aluminio entre la boca del frasco y la tapa del mismo, colocar otra capa más de papel aluminio cubriendo la parte superior del frasco y sellar con parafilm. Etiquetar con los datos necesarios para su posterior identificación. Las muestras deben mantenerse frías durante el periodo de colecta y transporte. La muestra deberá congelarse a -15°C hasta su análisis.

Método analítico para cuantificar COPs en tejido

El método de extracción de COPs en tejido se basa en el método desarrollado y validado por Jensen *et al.*, (2003), el cual se divide en tres etapas: 1) Extracción de los lípidos del tejido; 2) Extracción de los analitos de los lípidos; 3) Limpieza de la muestra.



1. Extracción de los lípidos del tejido.

Se pesan 10 gramos de la muestra que son colocados en un embudo de vidrio, con filtro de vidrio (embudo de separación de fondo plano No. 1). Se adiciona el estándar interno (PCB-141) y se procede a la primera extracción líquido-líquido adicionando 25 ml de isopropanol y 10 ml de dietileter. Enseguida la muestra se muele durante 1 minuto y se deja reposar otro minuto. Posteriormente se abre la llave de paso del embudo No.1 y el solvente es colectado en un segundo embudo (de vidrio sin filtro) que contiene 50 ml de H_3PO_4 0.1 M disuelto en NaCl al 0.9 %.

Se realiza una segunda extracción líquido-líquido del embudo No.1 adicionando 10 ml de isopropanol y 25 ml de una mezcla de hexano:dietileter (9:1), moler nuevamente por un minuto y reposar por otro minuto. El solvente es colectado en el embudo No. 2.

Una tercera extracción se lleva a cabo añadiendo al embudo No. 1, 25 ml de hexano:dietileter (9:1), agitando con varilla de vidrio durante un minuto y dejar reposar por otro minuto más. Finalmente se permite que el solvente baje al embudo No. 2.

El embudo No. 2 se agita suavemente durante un minuto y se deja reposar hasta obtener dos fases, la orgánica (superior) y la acuosa (inferior). La fase acuosa se transfiere a un vaso de precipitado. La fase orgánica se colecta en un vaso de precipitado de 100 ml, previamente pesado.

La fase acuosa se transfiere de nueva cuenta al embudo No. 2 para realizar una segunda extracción con 10 ml de una mezcla de hexano:dietileter (9:1). Se agita suavemente y se deja reposar hasta obtener las dos fases. Se vuelve a descartar la fase acuosa (inferior) y nuevamente se colecta la fase orgánica (superior) al vaso de precipitado que contiene el material obtenido en la primera extracción.

Para determinar la cantidad de lípidos, se deja evaporar el solvente del vaso de precipitado que contiene las fases orgánicas (el vaso puede dejarse toda la noche en una campana de extracción y al día siguiente, si aún no se evapora el solvente, puede colocarse en baño de agua a 37°C por períodos de 30 minutos hasta alcanzar un peso constante). Cuando el



solvente se ha evaporado se determina entonces el peso y por diferencia de pesos se obtiene el peso de los lípidos.

2. Extracción de los analitos de los lípidos.

Los lípidos se disuelven con 1 ml de hexano y son transferidos a un tubo de ensaye (tubo No. 1). El vaso donde estaban los lípidos se lava tres veces con hexano empleando 0.5 ml cada vez. Los lavados son transferidos al tubo No. 1. Al final se ajusta el volumen de hexano hasta tener una proporción de 1 ml de solvente por cada 100 mg de lípidos. Adicionar al tubo de ensaye, el mismo volumen de H₂SO₄ concentrado que se haya adicionado de hexano y mezclar por inversión durante 2 minutos. Centrifugar a 3,000 rpm por 5 minutos. La fase orgánica (superior) se transfiere a un segundo tubo. La fase ácida (inferior) se lava con 3 ml de hexano, se agita por inversión durante dos minutos y se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica es transferida al segundo tubo. Las fases orgánicas colectadas en el segundo tubo son evaporadas hasta aproximadamente 0.5 ml empleando corriente de nitrógeno y calentamiento (37 °C) para posteriormente realizar la limpieza.

3. Limpieza de la muestra.

a) Activación de la sílica gel.

La sílica gel se activa en una estufa a 280°C durante 24h, se deja enfriar a temperatura ambiente y se transfiere a un frasco de vidrio ámbar, éste se coloca en un desecador para conservar la sílica activada. Ésta debe usarse por un periodo de no más de 7 días.

b) Preparación de las columnas.

Se preparan las columnas de la siguiente manera: en una pipeta Pasteur de punta larga se coloca un tapón de lana de vidrio silanizada, se agrega 0.1 g de una mezcla de SiO₂act:KOH 1M (2:1), 0.9 g de una mezcla de SiO₂act:H₂SO₄ conc. (2:1) y 0.1 g de sulfato de sodio anhidro.

c) Limpieza de la muestra.



La columna se acondiciona con 8 ml de una mezcla de DCM (dicloro metano):hexano (3:1). Se adiciona el extracto obtenido del segundo tubo y los analitos se eluyen con 8 ml de una mezcla de DCM:hexano (3:1). Se realiza un cambio de solvente de DCM a hexano por medio de una corriente suave de nitrógeno a 37°C en un evaporador y la muestra se concentra a 100 µl y se transfiere a un vial para su posterior análisis cromatográfico.

Referencias del Anexo

- Jensen, S., Hägggerg, L., Jörundsdóttir, H., Odham, G. 2003. A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. *J. Agricultural and food chemistry*. 51(19): 5607-5611.
- Subramanian KS. 1987. Determination of lead in blood: Comparison of two GFAAS methods. *At. Spectrosc*, 8:7–14.
- Trejo-Acevedo, A.; I.N. Pérez-Maldonado; L. Carrizales; G. Dominguez; M. Yarto; R. Costilla; F. Díaz-Barriga. Biomonitoring of Persistent Organic Pollutants and Metals in Mexican Children. (En prensa)



ANEXO III.- RESULTADOS DE COPS EN IGUANAS CAPTURADAS EN COATZACOALCOS.

Con los resultados obtenidos se generará un artículo científico para ser publicado en una revista con arbitraje internacional, el título provisional de la publicación es:

Título provisional: Persistent Organic Pollutants in endangered species of iguana of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico.

Debido a su popularidad como mascotas y alimento en México e incluso en países de América Latina, las iguanas (*Iguana iguana* y *Ctenosaura pectinata*) están registradas en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), por lo tanto están consideradas como especie en riesgo (CITES, 2007). En México, la iguana se encuentra registrada en el proyecto de norma PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008 bajo el estatus de especie protegida. Los estudios de exposición a contaminantes que se han realizado en la región de Coatzacoalcos se enfocan principalmente en fauna acuática, mientras que la fauna terrestre no ha sido estudiada. La iguana representa un recurso alimenticio muy importante en los habitantes de la zona (Lara-López y González-Romero, 2002).

Monitoreo ambiental

En la Figura 1 se presentan las concentraciones de COPs en muestras de suelo donde se capturaron las iguanas (Intersección 1, 2 y 3; n = 3), únicamente el HCB está por encima (4.7 veces) de los límites establecidos por la Guías Canadienses de Calidad Ambiental (CEQG, por sus siglas en inglés) y/o por la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (SQuiRT-NOAA, por sus siglas en inglés), de Estados Unidos.

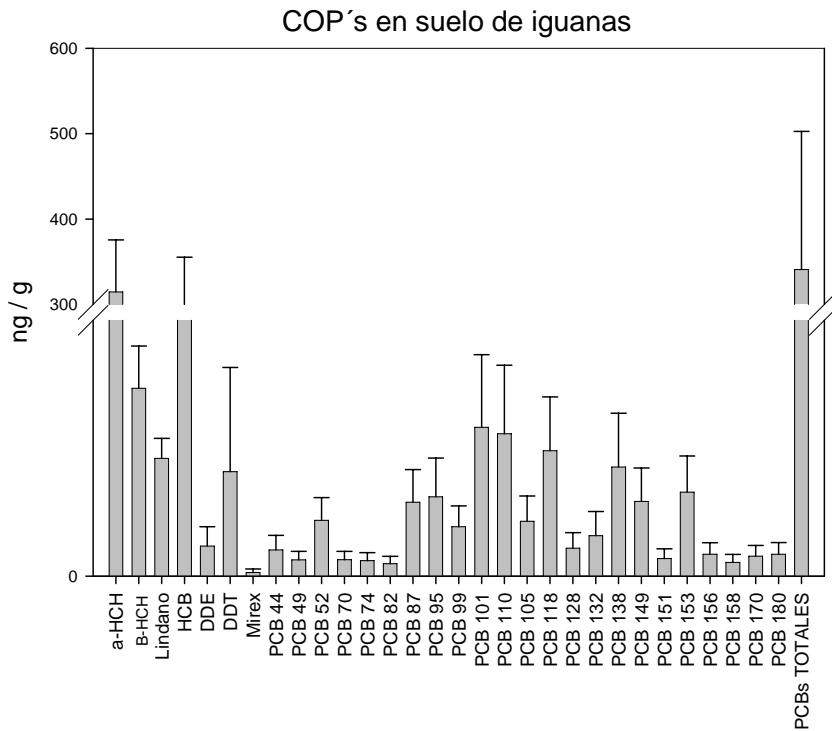


Figura 1.- Concentraciones de COPs en suelo (media+error estándar) donde se capturaron las iguanas.

Se lograron capturar nueve iguanas en la localidad de Intersección; éstas se pesaron, se determinó su sexo, se registraron medidas morfométricas y se revisaron detalladamente para detectar la presencia de ectoparásitos (Cuadro 1). Se les extrajo sangre para realizar la cuantificación de COPs. No se registraron ectoparásitos ni malformaciones en los organismos capturados.

Cuadro 1.- Datos morfométricos registrados en iguanas capturadas en Intersección

Número de individuo	Largo Total (cm)	Cola Vertebral (cm)	Sexo	Peso (gr.)	Ecto-parásitos	Estadio	Nombre científico	Nombre común
1	54.0	36.0	♂	207.1	0	juvenil	<i>Iguana iguana</i>	
2	47.0	31.0	♀	128.3	0	juvenil	<i>I. iguana</i>	
3	34.6	24.0	---	37.3	0	cría	<i>I. iguana</i>	Iguana
4	61.0	39.0	♀	280.0	0	subadulto	<i>I. iguana</i>	verde
5	65.0	41.0	♀	421.0	0	subadulto	<i>I. iguana</i>	
6	61.0	35.4	♀	549.0	0	subadulto	<i>I. iguana</i>	
7	76.0	43.2*	♂	964.0	0	adulto	<i>Ctenosaura pectinata</i>	
8	62.0	35.2*	♂	802.7	0	adulto	<i>C. pectinata</i>	Iguana negra
9	62.0	31.0	♂	821.0	0	adulto	<i>C. pectinata</i>	

*Organismos con cola incompleta, ♀ = hembra, ♂ = macho, --- = no se obtuvo dato.



Para ninguna de las nueve iguanas capturadas fue posible obtener un volumen adecuado de muestra (2 mL) requeridos para el análisis de COPs en sangre; por ello, sólo se muestran las concentraciones de estos compuestos de tres organismos. Debido a que las iguanas se encuentran en el PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008 se sacrificaron tres organismos (el mínimo estadístico) y se recolectó una iguana muerta. En total se contó con cuatro organismos de los cuales se pudo obtener diferentes tejidos (adiposo, hepático y músculo) quedando la relación de la siguiente manera: tejido hepático (cuatro muestras), tejido muscular (tres muestras), tejido adiposo (dos muestras) y plasma (tres muestras). Es importante hacer notar que dos de los organismos no presentaron tejido adiposo, y en uno de estos, por su tamaño, tampoco se logró obtener tejido muscular. Las iguanas únicamente pudieron ser recolectadas en el sitio denominado intersección.

COPs en Plasma

En la Figura 2 se muestran los valores de COPs (ng/g lip) cuantificados en plasma de iguanas verde y negra (*Iguana iguana* y *Ctenosaura pectinata*, respectivamente). Se encontraron cuatro congéneres de PCBs (52, 153, 180 y 170); no se tienen valores de referencia para poder comparar y tampoco se encontraron trabajos relacionados en la literatura científica.

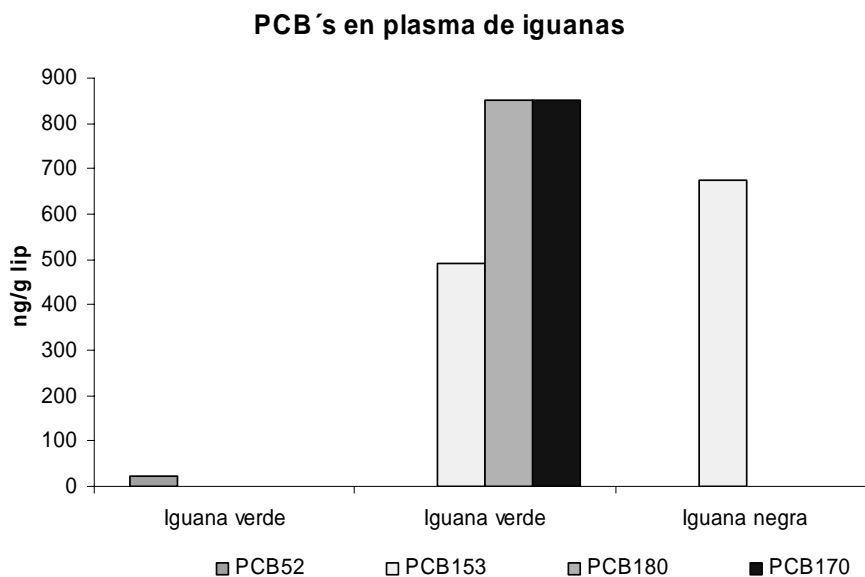
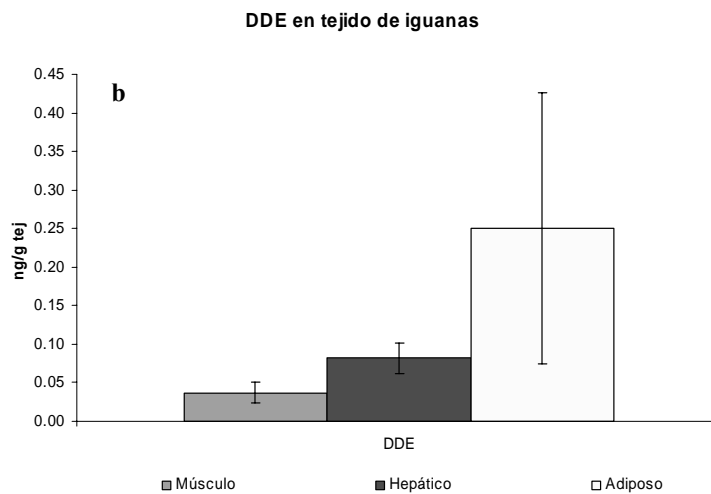
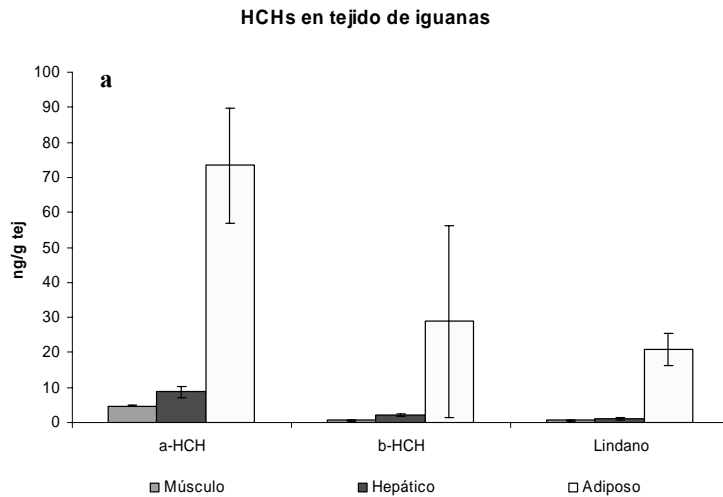


Figura 2.- Valores de COPs (ng/g lip) en plasma registrados en iguanas capturadas en Coatzacoalcos Veracruz.



COPs en tejido

En la Figura 3 se muestran las concentraciones de diferentes Contaminantes Orgánicos Persistentes (media \pm Error Estándar) ajustados por gramo de tejido en músculo, hígado y tejido adiposo de iguanas. En los HCHs y el DDE las concentraciones son mayores en el tejido adiposo seguido por los tejidos hepático y muscular. Los niveles más elevados de mirex se registraron en el hígado. Respecto a los congéneres de PCBs registrados en tejidos sólo el PCB 170 y 180 se registraron en músculo, hígado y plasma. No se detectó ningún congénere de PCB's en tejido adiposo.



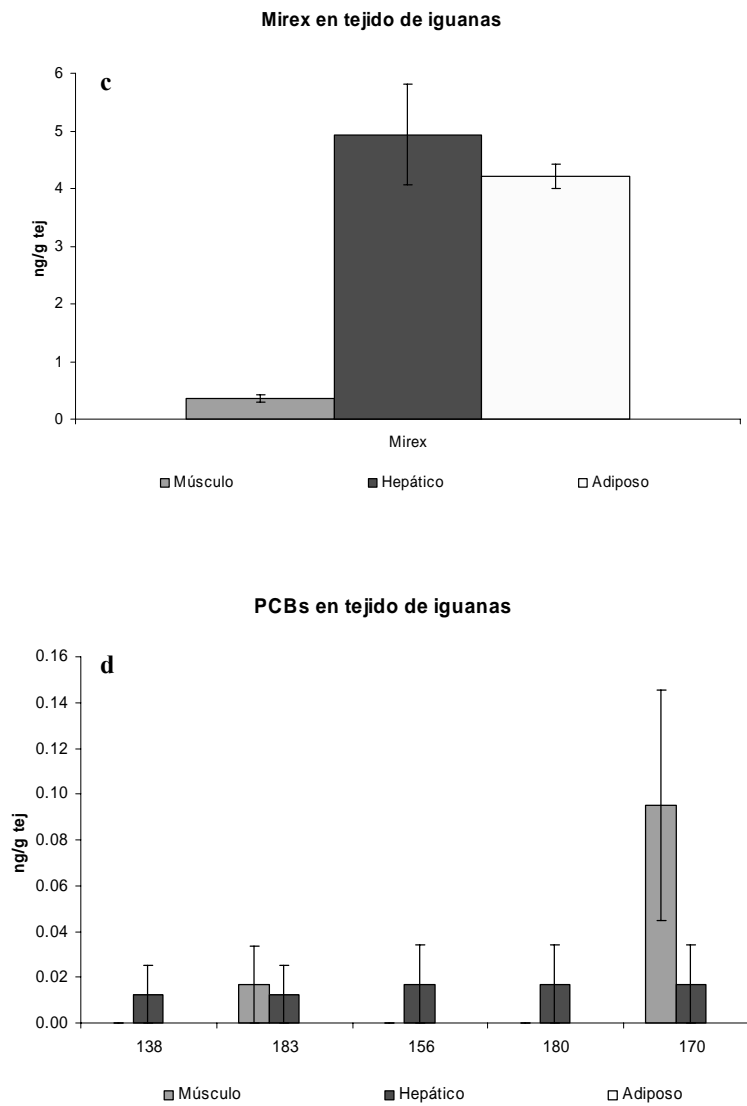


Figura 3.- Concentración (media±EE) de **a**) HCHs; **b**) DDE; **c**) Mirex; **d**) PCBs (ng /g tej) en músculo (n=3), hígado (n=4) y tejido adiposo (n=2) de iguana.



Referencias del Anexo

- CITES. 2007. Appendices I, II and III of Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). United Nations Environment Programme (UNEP). 46 p.
- Lara-López, M.S. y A. González-Romero. 2002. Alimentación de la iguana verde Iguana iguana (Squamata: Iguanidae) en la Mancha, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 85: 139-152
- PROY-NOM-059-SEMARNAT-2008. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. D.O.F. 5 de diciembre de 2008. México D.F. 96 p.