

POTENCIALIDAD MUTAGÉNICA Y GENOTÓXICA DE AFLUENTES DE UNA PLANTA DE
POTABILIZACIÓN DEL SUROCCIDENTE DE MEDELLÍN (PLANTA “A”)

JOSE FERNANDO OÑATE
ARY FABIAN PARUMA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2007

POTENCIALIDAD MUTAGÉNICA Y GENOTÓXICA DE AFLUENTES DE UNA PLANTA DE
POTABILIZACIÓN DEL SUROCCIDENTE DE MEDELLÍN (PLANTA “A”)

JOSE FERNANDO OÑATE

ARY FABIAN PARUMA

Trabajo de grado presentado para optar el título de Biólogo

Director

MSc. SILVIO MARINO CARVAJAL

Dra. MARGARITA ZULETA B (⊥).

Asesora científica

Universidad de Antioquia

Dr. IVÁN MELÉNDEZ

Asesor técnico

Universidad de Antioquia

MSc. JANETH OROZCO

Asesora técnica

Universidad de Antioquia

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2007

Nota de aceptación:

Director de tesis: MSc. Silvio Carvajal

Jurado. Ph.D Nohelia Cajas

Jurado. MSc. Patricia Acosta

Fecha de sustentación: 22 de noviembre de 2007.

Agradecimientos.

Damos gracias a Dios, porque nos da la vida, salud y allanó los caminos para poder culminar esta etapa de nuestras vidas.

Agradecemos a COLCIENCIAS y el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental de la Universidad de Antioquia, por su gran colaboración, eficiente y oportuna en la realización de nuestro trabajo de grado.

Agradecimientos a nuestros asesores: Dr. Iván Meléndez, MSc. Janeth Orozco, Dra. Isabel Ortiz; profesores: MSc. Luz Stella Hoyos, Dra. Nohelia Cajas, nuestro director de tesis, MSc. Silvio Carvajal y al grupo de Toxicología Genética y Citogenética por sus valiosas enseñanzas y aportes que fueron un faro en este trabajo de grado.

También queremos agradecer a nuestros Padres: Ernesto Oñate, Aurora Garzón, Ary Paruma y Ana Velasco, por su apoyo moral, afectivo y económico que nos brindaron incondicionalmente, pues nos acompañó en este largo camino de esfuerzos, sufrimientos y éxitos. A tíos, hermanos y amigos, por su desinteresada compañía y colaboración, por su constante motivación y confianza que no nos dejaron rendir y nos dieron fuerzas para continuar.

Por último este trabajo es dedicado a la memoria de nuestra Maestra y Amiga, Dra. Margarita Zuleta, que además de enseñarnos a investigar mutagénesis, nos dejó como legado de su sabiduría, “que la riqueza más grande de la vida, es el amor”.

José y Fabián

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. PROBLEMA	19
2. JUSTIFICACIÓN	22
2.1 IMPACTO SOCIAL	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GENERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. ANTECEDENTES	29
5. MARCO TEÓRICO	36
5.1. MUTÁGENOS Y CARCINÓGENOS ASOCIADOS A AGUAS RESIDUALES Y POTABLES	36
5.2. RETENCION DEL MATERIAL ORGANICO DEL AGUA MEDIANTE RESINAS MACRORETICULARES AMBERLITA XAD	42
5.3. TEST DE ÁMES	44
5.3.1. Activación metabólica con la fracción microsomal de hígado de rata S-9	46
5.4. ENSAYO COMETA	46
5.5. RIESGO DE LOS MUTÁGENOS	49
6. METODOLOGÍA	52
6.1. TOMA DE MUESTRAS	52
6.2. CONCENTRACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL MATERIAL ORGÁNICO	53

6.3. DETECCIÓN DE POTENCIALIDAD MUTAGÉNICA POR EL TEST DE AMES	54
6.3.1. Inducción de enzimas de hígado de rata.	56
6.3.2. Procesamiento.	56
6.3.3. Preparación de la fracción S-9 de homogenizado de hígado.	56
6.3.4. Estabilidad de las fracciones de S-9 congeladas.	57
6.3.5. Recomendaciones.	58
6.3.6. Mezcla de S-9.	58
6.4. DETECCIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR ENSAYO COMETA Y EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD (VIABILIDAD CELULAR) MEDIANTE COLORACIÓN CON AZUL DE TRIPAN.	58
7. RESULTADOS	61
7.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	61
7.2. COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO OBTENIDO POR RESINAS Y DESTILACIÓN DE PELÍCULA ASCENDENTE, EN LA QUEBRADA LAS PALMAS	63
7.2.1. Comparación de la mutagenicidad inducida por 3mg/m de extracto de la quebrada Las Palmas, obtenido por resinas y destilación de película ascendente, en las cepas TA98 y TA100 con y sin S9	64
7.3. MUTAGENICIDAD EVALUADA POR EL TEST DE AMES, CEPAS TA98 Y TA100, CON Y SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA	64
7.3.1 Análisis de asociación entre la concentración del extracto y el IM	66
7.4. IDENTIFICACIÓN DE DAÑO DE ADN (EFECTO GENOTÓXICO), MEDIANTE EL ENSAYO COMETA	69
7.5. IDENTIFICACIÓN DE GENOTOXICIDAD, MEDIANTE LA VIABILIDAD CELULAR CON AZUL DE TRIPANO	71
7.6. IDENTIFICACION DE MUTAGENOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS GC/MS	74
8. DISCUSIÓN	76
9. CONCLUSIONES	83

10. IMPACTO SOCIAL ESPERADO A PARTIR DEL USO DE LOS RESULTADOS	85
11. RECOMENDACIONES	86
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	117

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Índice de Mutación registrado en dos Sitios (Palma y planta “A”), con dos Cepa (TA-98 y TA-100), y Con y Sin Activación Metabólica para siete Concentraciones de Extracto acuoso.	65
Tabla 2. Subconjuntos homogéneos de la combinación de Cepa, Sitio y Activación Metabólica (S9) mediante el test de Duncan.	66
Tabla 3. Estadísticos descriptivos. Variable dependiente: ÍNDICE DE MUTACIÓN	68
Tabla 4. Longitud de cola inducida por dosis, sitio de muestreo e Interacción entre dosis y sitio de muestreo. También se observa la F y la p de ANOVA para cada caso.	69
Tabla 5. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de daño inducido por los extractos de las Palmas y de la planta “A” a las diferentes dosis evaluadas.	71

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de activación de aminas heterocíclicas (Arlaminas) por metabolismo para inducir mutación.	40
Figura 2. Mecanismo de acción del nitropireno, un hidrocarburo policíclico aromático, que después de ser activado por metabolismo, forma aducto con la guanina del DNA.	41
Figura 3. Metabolismo de dimetilnitrosamina mediante CYP 2E1	42
Figura 4. Fotografía real de un resultado de ensayo de <i>Salmonella typhimurium</i> . Se observan claramente las colonias revertantes.	46
Figura 5. Fotografía tomada en un microscopio de fluorescencia en 40X. Se observan las células dañadas (cometa), debido a la tinción con bromuro de etidio.	49
Figura 6. Área geográfica de las aguas en objeto de estudio.	52
Figura 7. Protocolo ilustrativo para llevar a cabo el test de Ames.	55
Figura 8. Protocolo ilustrativo del ensayo cometa.	60
Figura 9. Cantidad de extracto en mg obtenido por los dos métodos de extracción.	63
Figura 10. Comparación del IM de la cepa TA98 Y TA100 con y sin S9, tratadas con 3mg/ml de extracto de Las Palmas obtenido por resinas y por destilación de película ascendente	64
Figura 11. Asociación lineal positiva entre dosis e índice mutagénico.	67
Figura 12. Asociación lineal positiva entre longitud de cola y concentración de extracto de dos sitios de muestreo: Las Palmas y de la planta "A".	70
Figura 13. Porcentaje de linfocitos humanos dañados, expuestos una hora a seis tratamientos distintos de extracto de agua en equivalentes mililitros, tanto de la quebrada Las Palmas como agua cruda al entrar a la planta "A"	72

Figura 14. Viabilidad de linfocitos humanos después de una hora de tratamiento con agua de Las Palmas y agua cruda al entrar a la planta “A” medido mediante coloración con azul de tripano.	72
Figura 15a. Asociación lineal negativa entre diferentes concentraciones de extracto de Las Palmas y porcentaje de viabilidad celular.	73
Figura 15b. Asociación lineal negativa entre diferentes concentraciones de extracto de la planta “A” y porcentaje de viabilidad celular.	73
Figura16. Mutágenos encontrados en el agua de la quebrada Las Palmas y agua cruda de la planta “A” . a) bis(2-etilhexil)ptalato., b) 1-fenil antraceno c) benzo (a)pireno	74

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Estadísticos descriptivos del IM con respecto al Sitio, Cepa, Activación metabólica y Dosis.	117

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Características de las Resinas XAD2.	44
Cuadro 2. Promedio de revertantes espontaneas de los controles negativos en las cepas TA98 y TA100, con y sin S9.	62

GLOSARIO

Adenocarcinoma: es un carcinoma que tiene su origen en células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción externa. Estas células son las encargadas de sintetizar y de verter los productos que generan en la luz glandular.

Aminoácido: Unidad básica de las proteínas

Aneuploidía: Condición en la que una célula u organismo contiene algunos cromosomas de más o de menos que la forma normal.

Biopelícula: Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen.

Codón: Secuencia de 3 nucleótidos que codifican un aminoácido.

Cáncer: Crecimiento exagerado y anormal de células que pierden su función y que son capaces de invadir otros tejidos y reproducirse en ellos.

Enfermedad caracterizada por la proliferación desordenada de las células, provocando graves alteraciones en la forma y en la función de los tejidos orgánicos afectados. En la mayoría de los cánceres, las células enfermas se agrupan en masas denominadas tumores malignos. En el caso de las leucemias, las células cancerosas se diseminan por el aparato circulatorio.

Carcinógeno agente físico, químico o biológico que puede producir cáncer

Carcinogénesis: La carcinogénesis es un proceso que consta de múltiples fases producidas por daños genéticos y epigenéticos que son inducidos por un carcinógeno en células susceptibles las cuales adquieren una ventaja de crecimiento selectivo y sufren expansión clonal como resultado de la activación de proto-oncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores. Es el proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas.

Célula: es la unidad estructural y funcional principal de los seres vivos.

Detoxificación: Proceso enzimático para eliminar xenobióticos

Extracto total: extracto obtenido después de concentrar 100 L de agua

Fracciones básicas, ácidas y neutras: fracciones obtenidas a partir del extracto total donde se espera obtener compuestos ácidos, básicos y neutros

Fracciones huminas, fúlvicas húmicas: fraccionamiento que se le hace al extracto total para separar los compuestos húmicos de los fúlvicos y de las huminas

Gen: Segmento de DNA que tiene la información para producir proteínas

Genotóxico: Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN causando daños en su estructura molecular

Gen supresor de tumores: gen que codifica un producto que normalmente suprime la división celular. Las mutaciones en los genes supresores de tumores dan lugar a la activación de la división celular y a la formación del tumor.

Mielodisplasia: Trastorno que afecta el desarrollo de la columna vertebral, la médula espinal, el saco con líquido que la rodea y los nervios adyacentes. Puede provocar que una parte de la médula espinal y de las estructuras circundantes se desarrollen por fuera y no por dentro del cuerpo. Dicha anomalía puede producirse en cualquier segmento de la columna vertebral.

Mutación: Una alteración estructural permanente en el material genético (ADN) que altera la función del gen y se transmite a todas las células hijas.

Mutación por sustitución de bases: un par de bases del ADN cambia por otro par

Mutágeno: Un agente químico, físico o biológico que induce mutaciones a través del daño producido en el ADN

Mutágeno directo: agente químico que se une directamente al DNA sin necesidad de biotransformarse.

Mutágeno indirecto: agente químico que necesita de una activación metabólica para unirse al DNA

Nucleótido: Unidad básica de los ácidos nucleicos (ADN, ARN)

Oncogen: Un gen que es capaz de hacer que las células normales se convierta en células cancerosas

Reparación del DNA: Proceso enzimático que elimina daños en el DNA causado por genotóxicos

Sinergismo: La sinergia es la integración de elementos que da como resultado algo más grande que la simple suma de éstos, es decir, cuando dos o más elementos se unen sinérgicamente crean un resultado que maximiza las cualidades de cada uno de los elementos.

Trihalometanos: Sustancias químicas tóxicas que consisten en una molécula de metano y un elemento halógeno flúor, bromo, cloro iodo unido a tres posiciones de la molécula. Generalmente tienen propiedades carcinogénica

Xenobiótico: Sustancias extrañas a la célula

RESUMEN

Se evaluó el potencial mutagénico y genotóxico del agua de la quebrada Las Palmas que es un afluente de la planta de potabilización “A”, que es la planta de tratamiento de aguas más importante del Suroccidente de Medellín y municipios aledaños, abasteciendo a más de dos millones de habitantes. Este afluente se contamina con residuos domiciliarios, de restaurantes de carnes fritas y asadas, de carpinterías y agroquímicos.

La mutagenicidad se evaluó *in vitro* usando el test de Ames con cepas TA98 y TA100 en presencia y ausencia de S9 para activación metabólica. El análisis genotóxico se hizo en linfocitos humanos usando el ensayo cometa. Se analizaron dos sitios de muestreo: quebrada las Palmas y el agua cruda que entra a la planta de potabilización “A”.

Los resultados de mutagenicidad (IM), mostraron asociación lineal positiva con la concentración de los extractos de agua (efecto de dosis) y fue dependiente del tipo de cepa bacterial. La cepa TA98, por pérdida o ganancia de bases mostró mayor mutagenicidad y de la activación metabólica (en presencia de S9 se detectó mayor mutagenicidad). Entre los dos sitios (Palmas y planta “A”) se registro una diferencia relativamente pequeña.

Los resultados de genotoxicidad (longitud de cola) mostraron asociación lineal positiva con la concentración de los extractos de agua (efecto de dosis) y fue independiente de los sitios de muestreo. La longitud de cola se correlaciona negativamente con la viabilidad celular y directamente con el porcentaje de daño.

Estos resultados proveen evidencia que el agua que llega a la planta “A” ha perdido muchos mutágenos debido a la sedimentación y procesos fóticos y afóticos que ha sufrido el agua en una represa previo a ser transportada subterráneamente hacia la planta “A”. Por el contrario las aguas de la quebrada Las Palmas recibe continuamente contaminantes mutagénicos.

INTRODUCCIÓN

Un ambiente acuático, como un río, es un depositario de descargas antropogénicas, domésticas, agrícolas e industriales, constituyéndose así en reservorios potenciales de mutágenos, y estos ríos son utilizados como fuente de agua potable (*Kataoka et al., 2000*). Muchos estudios han revelado que las aguas superficiales pueden contaminarse con genotóxicos a través de diferentes fuentes como desechos industriales (*Ohe , 1997; Shen et al., 2003*). Consecuentemente la contaminación del agua puede ser un serio problema para la salud humana y un riesgo para el ecosistema acuático. Muchos estudios a nivel mundial han determinado que las aguas de los ríos contaminados presentan propiedades genotóxicas y mutagénicas (*Ohe et al 2003*), debido a los compuestos tales como las aminas heterocíclicas (AHs) (*Ohe et al., 1997*) formadas en las partes quemadas de carnes fritas y asadas, que pueden llegar al agua por la orina y heces fecales; hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) formados por la combustión incompleta del material orgánico (*Marston et al 2001; Yang et al 2003*), entre otros desechos (*Kleinsasser et al 2000; Vargas et al 2001*).

La planta de potabilización “A”, ubicada al suroccidente de Medellín (Colombia), que distribuye agua potable a más de 1.500.000 habitantes de la parte sur de Medellín y municipios aledaños, potabiliza agua procedente de la represa La Fe, la cual se abastece de las quebradas Las Palmas y otros ríos que pueden estar contaminados con agroquímicos, desechos industriales y aguas negras domiciliarias. La quebrada Las Palmas, además, recibe aguas negras provenientes del corregimiento de Las Palmas, de algunas veredas y de expendio de carnes fritas y asadas, así como de carpinterías, ricas en solventes mutagénicos, y bombas de gasolina.

En consecuencia, los desechos finalmente pueden llegar a la planta “A”, donde el agua recibirá un proceso de potabilización que no garantiza la eliminación total de los mutacarcinógenos disueltos en el agua y que, al reaccionar con el cloro, forman trihalometanos y otros subproductos, muchos de los cuales son fuertes mutacarcinógenos (*García et al, 1997; Bull et al, 1995 y Xu et al, 1997*) que pueden llegar a los domicilios (*Meléndez et al, 2001*).

El ensayo de mutagenicidad de Ames, que consiste en cepas de *Salmonella typhimurium* con mutación en el operón histidina, determinan si algún compuesto o mezcla es mutagénica o no, dependiendo de la cantidad de colonias revertantes de his- a his+. Este ensayo, ha sido ampliamente usado para detectar actividad mutagénica en mezclas complejas ambientales, así como de agua de río. Cepas altamente sensibles responden a aminas aromáticas y/o nitrocompuestos que también han sido encontrados ambientalmente en algunas aguas superficiales (*Kusamran et al., 1994; Kataoka et al., 2000; Goto et al., 2000*).

No existen muchos estudios de genotoxicidad en aguas evaluadas mediante el ensayo Cometa, por lo tanto, es de gran importancia evaluar la genotoxicidad del extracto del agua de Las Palmas y de la Planta “A” en linfocitos humanos, ya que permite observar si hay interacción de estos mutágenos con el ADN de células humanas.

Hasta la fecha, en Colombia, no hay reporte de estudios de genotoxicidad y mutagenicidad de estas aguas, pero si se han realizado estudios de mutagénesis e identificación de mutágenos en aguas de río Rionegro y su respectiva planta, y en la Planta de Villa Hermosa, trabajos realizados por el Grupo de Mutagénesis Ambiental de la Universidad de Antioquia.

1. PROBLEMA E HIPÓTESIS

La planta potabilizadora “A”, que abastece a 1.5 millones de habitantes de la parte sur de Medellín, El Poblado, Envigado y Sabaneta, recibe agua procedente de la represa La Fé, la cual se nutre de las quebradas Las Palmas, Potreros, La Miel, Espíritu Santo y de los ríos Buey, Piedras y Pantanillo. Todos estos ríos y quebradas pasan por zonas agropecuarias y cultivos de flores de donde pueden recibir agroquímicos a través de lixiviados y escorrentías. Gran cantidad de los agroquímicos, tales como los pesticidas, han resultado ser mutagénicos y/o carcinogénicos. (Zuleta et al., 1990; Morelli, 2000; Cabello et al., 2001). La quebrada Las Palmas recibe aguas residuales domiciliarias provenientes del corregimiento de Las Palmas, de algunas veredas y de expendio de carnes fritas y asadas, también como de carpinterías, ricas en solventes mutagénicos.

El río Pantanillo, que es un afluente de la planta “A”, recibe las aguas negras del municipio El Retiro, después de que han sido tratadas en una planta biológica a base de lodos activados, situada en el Retiro, propiedad de las Empresas Públicas de Medellín. Se comprobó que esta planta no sustrae completamente los mutágenos presentes en las aguas negras (Orozco et al., 2003). En consecuencia, el río Pantanillo recibe gran cantidad de aminas heterocíclicas mutacarcinogénicas procedentes de las aguas negras del Retiro, tales como las aminas heterocíclicas IQ (2-amino 3-metil imidazo [4,5-f] quinolina), MeIQ (2-amino 3-4 dimetil imidazo [4,5-f] quinolina), Trp-P1 (3-amino-1-4 dimetil -5H pirido [4,3b] indol) y Trp-P2 (3-amino-1 dimetil -5H pirido [4,3b] indol). Este río también debe contener hidrocarburos policíclicos aromáticos procedentes de las aguas negras (Orozco et al., 2003).

El grupo de mutagénesis de la Universidad de Antioquia, encontró que los afluentes que surten plantas de potabilización de agua del departamento de

Antioquia producen alta mutagenicidad (*Duque y Zuleta, 2005*) y se ha comprobado que los mutágenos no son eliminados por los sistemas de purificación de las plantas de tratamiento, por lo tanto, los mutágenos que llegan a la planta pueden llegar hasta las aguas domiciliarias. Esto se comprobó en un trabajo hecho en la planta de tratamiento de Villa Hermosa (*Meléndez et al, 2001*) y en la planta de Rionegro (Antioquia) (*Zuleta et al, 2004*). En otro trabajo hecho en la planta de Rionegro Antioquia, también se encontró que la actividad mutagénica presentada por las aguas, al entrar en la planta de tratamiento, aumenta ostensiblemente después de que dichas aguas han sido tratadas con el coagulante sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), posiblemente debido a que el hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) reacciona con grupos funcionales de los ácidos fúlvicos, reduciendo quinonas y dando como producto final semiquinonas, radicales muy activos (*Zhang and Wang, 2000; Duque et al, en proceso de publicación*).

Por otra parte, la gran cantidad de material orgánico que continúa en las aguas después de la coagulación, floculación y sedimentación, reacciona con el cloro formando trihalometanos y subproductos, muchos de los cuales son fuertes mutacarcinógenos (*Bull RJ et al, 1995; Xu et al, 1997; García et al, 1997; Monarca et al, 2004*).

Es importante detectar mutágenos en aguas que surten plantas de potabilización, por que según *Meléndez et al, 2001* estos llegan hasta los domicilios. Existe una estrecha relación entre la exposición crónica a bajas dosis de mutágenos y la incidencia de cáncer, a través de la fijación de mutaciones (*Pohjola et al., 2003*).

Debe tenerse en cuenta que la exposición crónica a pequeñísimas dosis de mutágenos puede resultar en la acumulación de mutaciones en células blanco, hasta convertirlas en iniciadoras del proceso carcinogénico.

Aunque las dosis de mutágenos contenidas en el agua son muy pequeñas, del orden de partes por billón (p.p.b), al llegar continuamente al organismo y no causar muerte celular, el daño genético puede acumularse en una sola célula hasta convertirla en cancerosa. Por lo tanto, es de suma importancia conocer las vías por las cuales llegan los mutágenos al organismo y así poderlos evitar. Con base en numerosas investigaciones se sabe que los mutágenos producen varias enfermedades, entre ellas el cáncer (Komulainen, 2004).

Por lo antes expuesto, en esta investigación se respondió el siguiente interrogante y se sometieron a prueba las hipótesis respectivas. ¿Los extractos del agua que alimenta la planta de potabilización “A”, por su contenido de sustancias de desecho, tendrán efecto mutagénico para la bacteria *Salmonella typhimorium* cepas (TA-100 y TA-98) y efecto genotóxico para linfocitos humanos cultivados *in vitro*?

Si las sustancias de desecho que contienen las aguas que alimentan la planta de potabilización “A” son mutagénicas, se espera que la frecuencia de revertantes de *Salmonella typhimorium* sea mayor en los cultivos bacterianos tratados con el agua que alimenta dicha planta, que en los cultivos bacteriales controles tratados con agua destilada estéril y DMSO.

Si el agua cruda que entra a la planta “A” contiene mutágenos, la frecuencia de daños a nivel de ADN (longitud de cola- prueba cometa) de los linfocitos humanos tratados con el agua de dicha planta, será mayor que el registrado en los linfocitos tratados con los controles negativos (DMSO Y PBS).

Finalmente, se espera que el efecto mutagénico dependa del sitio de origen del agua (Palmas y planta “A”), del tipo de bacteria (TA98 y TA100) y de la actividad metabólica.

2. JUSTIFICACION

La contaminación del agua es un problema de orden mundial, por ser un solvente universal y de constante consumo por parte de animales, plantas y seres humanos; es un recurso indispensable para la vida, por eso es imperante evitar su contaminación con mutágenos y carcinógenos, que pueden provenir del viento, lluvias, escorrentías, lixiviados, y del vertimiento de desechos industriales, domésticos, agroquímicos y pesticidas.

Los pesticidas y agroquímicos llegan a las aguas de consumo humano a través de lixiviados de zonas agrícolas y por acumulación en aguas subterráneas, que luego surten ríos y quebradas que alimentan plantas de potabilización. Se han encontrado pesticidas que llegan a los domicilios, por medio del agua potable (EWG, 1999). La mutagenicidad y carcinogenicidad de muchos pesticidas se ha demostrado ampliamente (Zuleta et al., 1990; Cantor et al., 1992; Sierra et al., 1998). Muchos de los desechos industriales y domésticos que presentan efecto mutagénico son frecuentemente vertidos en quebradas y ríos que alimentan plantas de potabilización (Zuleta et al., 2001; Randerath et al., 1999; Varga et al., 1993) y pueden llegar a los domicilios y ser consumidos constantemente por los usuarios. Estos contaminantes inducen mutación y algunos inducen cáncer en células de mamífero. Además, se ha demostrado que hay interacciones entre los diversos compuestos químicos presentes en el agua, formando nuevos compuestos que pueden inducir daño a nivel celular y que el tratamiento con cloro, ozono o cloramina, origina subproductos mutagénicos; en el caso del cloro, se forman halometanos como el MX (3-Cloro-4-diclorometil)-5-hidroxi-2-(5H)-furanona), responsable de daños al ADN y cáncer rectal.

El problema de la presencia de mutágenos y carcinógenos en aguas de consumo, es que no son retirados en el proceso de potabilización y llegan continuamente a

la población; aunque estén presentes en pequeñísimas concentraciones del orden de ppb aparentemente permisibles, estas bajas concentraciones no producen muerte celular, por lo tanto permiten la acumulación de mutaciones en una sola célula, que si se trata de células somáticas, pueden iniciar el proceso de carcinogénesis (*Poirier y A. Beldad, 1994*), además estudios epidemiológicos en países del primer mundo han mostrado que aguas potables que se surten de fuentes contaminadas son responsables en un 18% del cáncer de recto y en un 9% del cáncer de vejiga (*Morris et al., 1995*) La hipótesis de que los mutágenos presentes en el ambiente son responsables de la mayoría de los cánceres es ampliamente soportado por gran numero de estudios epidemiológicos (*Stemermann 1991; Coleman et al. 1993; DeVivo et al., 1994; IARC 1997^a y 1997^b Kakizoe 1997; Hartman, 1997*) y experimentales (*Setlow B. 2001; Ferguson et al., 2002; Wogan et al., 2004*). El hecho de que pocos cánceres son hereditarios, transmitidos por mutaciones en genes de células germinales, confirma la hipótesis de que la mayoría de los cánceres se deben a la interacción entre los factores ambientales y genéticos (*Minamoto et al., 1999*). Por lo tanto es, importante identificar los mutacarcinógenos que llegan a la población a través de agua de consumo, alimentos, drogas, exposición ocupacional como manejo de pesticidas y muchos residuos industriales, con el fin de evitar o disminuir la incidencia de muerte a causa de esta enfermedad.

Anualmente en el mundo ocurren alrededor de 10 millones de nuevos casos de cáncer y de estos mueren alrededor de 6 millones de personas. En Colombia ocurren alrededor de 60.000 nuevos casos de cáncer anualmente y mueren alrededor de 30.000 personas (*DANE, 1999; IARC, 2001; Pardo et al 2003*). En el periodo comprendido entre 1995 y 1999, se registraron 61.641 casos nuevos de cáncer por año. En Antioquia, los nuevos casos por año son 9.414 (15.3% del total del país), y los de mayor incidencia son: el cáncer de estómago con 982 casos por año, pulmón con 943 casos por año seguido por próstata y cuello uterino con 674 y 689 casos respectivamente. Aunque en el país se ha mejorado mucho en el tratamiento de algunos de los canceres, aun no se ha podido establecer medidas

de prevención que contribuyan a disminuir las altas tasas de mortalidad por esta causa y uno de los factores que la provoca es la exposición a mutágenos que en su mayoría es ambiental. Es importante adquirir conocimientos sobre estos agentes, en donde están presentes y como evitarlos, para dar lugar a la introducción de medidas preventivas para evitar la exposición principalmente a mutágenos en aguas de consumo.

En el futuro, el cáncer puede convertirse en la primera causa de muerte, teniendo en cuenta que hay muy poca prevención debido al desconocimiento de su causa (mutación), que se produce unos diez o veinte años antes de desarrollarse la enfermedad; es decir, la mutación es un enemigo silencioso que solo se manifiesta muchos años después.

Esta investigación es importante llevarla a cabo para confirmar la hipótesis de que el agua de la quebrada Las Palmas y el agua cruda de la planta "A", tienen actividad mutagénica y genotóxica.

El biomarcador utilizado en este trabajo, mas indicado para detectar actividad mutagénica fue el test de Ames, debido a que esta ampliamente validado (*McCann et al., 1975; McCann y Ames, 1976; Purchase et al., 1976; Sugimura et al., 1976; McCann y Ames, 1977; Bartsch et al., 1980*) y porque ha sido muy usado para determinar mutagenicidad de mezclas complejas ambientales y biológicas (*Maron y Ames, 1983*) que están presentes en gran proporción en el agua de ríos. Además la mayoría de mutágenos que primero se detectaron mediante este test, posteriormente mostraron ser carcinogénicos en bioensayos con animales.

También se usó el ensayo cometa porque es una técnica relativamente simple, rápida, económica y altamente sensible, que permite medir cualitativa y cuantitativamente el daño en el ADN de células individuales vegetales o animales expuestas a agentes físicos o químicos tales como: agroquímicos, pesticidas,

aditivos de comida, nitrosaminas, drogas antineoplásicas, metales pesados y químicos industriales (Kelvey et al., 1993; Fairbairn et al., 1995; Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000; Collins, 2004; Brendler et al., 2005). En este ensayo cometa específicamente se utilizó células de linfocitos humanos, porque el test de Ames trabaja con células bacterianas (procariotas) muy diferentes a las células humanas (eucariotas); no obstante los linfocitos humanos son un buen material para las investigaciones sobre la toxicidad y genotoxicidad de contaminantes orgánicos presentes en las aguas. Los resultados de este ensayo pueden demostrar los efectos adversos de los contaminantes sobre los humanos y se podría usar para predecir el riesgo sobre la salud humana (Li et al., 2006).

A nivel mundial, estudios como este, donde se complementan los ensayos Cometa y Ames, no se han realizado; además en Colombia este estudio reitera la importancia de evitar la contaminación masiva de las fuentes de agua.

En Colombia se han conducido pocos estudios sobre la mutagenicidad de aguas que alimentan plantas de tratamiento y sobre la incidencia que la contaminación y el proceso de potabilización tienen sobre la población que la consume, por lo tanto, hasta el momento se desconoce la magnitud del riesgo que representan para la salud los mutágenos que pueden llegar hasta la población a través del consumo del agua.

Determinando la presencia de mutágenos que tienen la capacidad de interactuar con el ADN humano, en aguas que surten plantas de tratamiento y complementándolo con la presencia de mutágenos en aguas domiciliarias, se podría llevar a cabo un estudio epidemiológico para ver la incidencia del consumo de esta agua sobre la presencia de cáncer.

Mediante el proceso de identificación de mutágenos se puede hacer el seguimiento de estos, para conocer más sobre su origen, transporte, cambios conformacionales (según Melendez et al., 2001, en la potabilización en vez de ser

eliminados los mutágenos aumentan su potencial mutagénico) y llegada a los domicilios; con esta información se podría prevenir la exposición a estos y controlar su presencia en las aguas.

El aporte que esta investigación hacia a la ciencia a nivel mundial es que los mutágenos presentes en aguas son capaces de provocar mutación directa e indirecta ya sea por sustitución o por pérdida y ganancia de bases, pero al mismo tiempo pueden interactuar con el ADN humano provocando quiebres de cadena sencilla o doble.

El aporte para el país es de tratar de incluir un nuevo parámetro de calidad de aguas en el decreto 475 de 1998 por el cual se expiden Normas Técnicas de Calidad de Aguas Potables, con el fin de disminuir la contaminación de fuentes hídricas mas aún si serán utilizadas para potabilización.

2.1 IMPACTO SOCIAL Y RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados de la presente investigación quedarán a disposición del público y de las entidades interesadas en la toma de medidas apropiadas que conduzcan a la disminución de la contaminación responsable de la presencia de mutacarcinógenos en las aguas de consumo. A largo plazo, repercutirá en el mejoramiento de la salud de la población que consume esta agua y servirá de base para la justificación del uso de pruebas de análisis mutagénico, en el control de calidad de aguas para el consumo humano.

Los afluentes que abastecen los reservorios utilizados para potabilización de aguas deben recorrer terrenos alejados de zonas agrícolas, industriales y domicilios, o por lo menos que las aguas negras de domicilios cercanos a los afluentes, se conduzcan por tuberías a sitios alejados de estos afluentes.

Los resultados de este proyecto servirán para construir una base de datos que, a largo plazo, permitirá realizar estudios para establecer una relación directa entre la exposición a mutacarcinógenos a través del agua, e incremento en la frecuencia de casos con cáncer.

Los estudios de mutacarcinógenos en aguas, son de gran importancia en los países desarrollados como: Estados Unidos, Japón, China, Canadá, Francia, Italia, etc, pero en Colombia, existen pocos ya que en este momento solo se están siendo realizados por el Grupo de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia. Teniendo en cuenta que en Colombia, el manejo de agua potable (nacimiento, trayectoria y potabilización del agua) es un problema generalizado y posiblemente contribuya al aumento de frecuencia de muerte por cáncer.

Se espera que con los resultados de esta investigación, se motiven otros grupos y se fortalezca la investigación en esta área para aportar conocimientos y posibles soluciones a este problema.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL: Determinar la potencialidad mutagénica y el efecto genotóxico de los extractos acuosos, de los afluentes de la planta de potabilización “A”.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto mutagénico de extractos acuosos del agua de la quebrada “Las Palmas” afluente de la planta de potabilización “A” y en aguas crudas, antes del tratamiento en dicha planta, por medio del test de Ames.
2. Evaluar, por medio del ensayo Cometa, la genotoxicidad inducida en linfocitos humanos, por extractos acuosos de la quebrada “Las Palmas” y el agua cruda, antes del tratamiento en la planta “A”.

4. ANTECEDENTES

Los ríos comúnmente son los depositario de descargas antropogénicas, domésticas, agrícolas e industriales, constituyéndose así en fuentes potenciales de mutágenos y a su vez son utilizados para alimentar plantas de potabilización (*Kataoka et al, 2000*).

Muchos estudios han revelado que las aguas superficiales pueden contaminarse con genotóxicos a través de diferentes fuentes como desechos de aguas negras (*Ohe Y, 1997; Shen et al, 2003*) que contienen amins heterocíclicas (AHs), con alta potencialidad mutacarcinogénica. Se ha demostrado que las AHs son mutacarcinogénicas en ratones y ratas (*Felton et al., 2002*). Los mutágenos también llegan a estos afluentes por medio de residuos industriales de aceites quemados y solventes orgánicos (*Alguacil et al., 2002*). Entre esos residuos están los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), formados por la combustión incompleta del material orgánico. Todos los HPA estudiados han resultado ser fuertes mutacarcinógenos comprometidos en la formación de diversos tipos de tumores, como el cáncer mamario, de próstata y de piel. (*Doak et al., 1985 ; Culp et al 1998; Rundle et al 2000; Rundle et al 2002; Phillip et al 2002*).

Basados en lo anterior, es muy posible que gran parte de las aguas de consumo contengan mutágenos y/o carcinógenos ya que los procesos de remoción de material orgánico no son muy eficientes y, además, no son efectivos en la retención de mutacarcinógenos.

Investigaciones hechas con sistemas modelo, muestran que la creatina juega un papel importante en la formación de mutágenos que contienen el anillo imidazo como IQ (*Jägerstad et al., 1984*), IQx (2-amino-3 metilimidazo [4,5-f] Quinolina), MeIQx (2-amino-3-metil-3h-imidazo(4,5f) quinolina), y DiMeIQx (2-amino-3,4-

dimetil-3h-imidazo(4,5f)quinolina) (Skog, 1993). Por la cocción de la carne también se pueden originar moléculas piridoindol tal como el 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4-5-b] piridina (PhIP). Recientes estudios han demostrado que el PhIP incrementa la proliferación del receptor estrogénico ER, obteniendo una respuesta mitogénica por activación de proteínas kinasas (MAPK) (Lauber *et al.*, 2004; Gooderham *et al.*, 2007), aumentando así la promoción y progresión de enfermedades neoplásicas. Todas las aminoarenas formadas en alimentos expuestos a altas temperaturas (fritos y asados) son potentes mutágenos y la mayoría de ellas han mostrado inducir cáncer en ratas, ratones y simios en diferentes órganos como hígado, pulmón, estómago, mama, intestino, páncreas, colon, vejiga y próstata (Schut *et al.*, 1997; Snyderwine *et al.* 1997; Nagao y Sugimura 2000; Delfino *et al.* 2000; Sachse *et al.* 2002; Snyderwine *et al.* 2003; Hung *et al.*, 2004; Knize and Felton, 2005).

Se han encontrado AHs en orina y heces fecales de personas que se alimentan con carnes fritas y asadas, por lo tanto, las aguas negras que son ricas en orines y heces fecales deben contener muchas AHs mutacarcinogénicas (Viberg *et al.*, 2006).

Ono Y *et al.*, 1999, encontraron en las aguas del río Kyoto (Japón), contaminado con aguas negras, la AH Trp-p-2. También se identificaron AHs por High Presion Liquid Chromatographyc (HPLC) y se midió el potencial mutagénico mediante el test de Salmonella typhimurium con las cepas NM2009 y NM2000 con y sin actividad de la o-acetiltransferasa respectivamente, en las aguas del río Fukui (Japón), con el cual se pudo sugerir que las muestras de agua en ese río eran muy mutagénicas (Watanabe T *et al.*, 2002). Umbuzeiro *et al.*, 2004, realizó análisis de calidad y descubrió en muestras de aguas en Brasil, mutágenos que, por adición o delección de nucleótidos del ADN, cambiaban el marco de lectura.

Algunas AHs incrementan el potencial mutagénico de otros mutágenos contenidos, tal es el caso del Trp-p-1 y el MeIQ que potencian la mutagenicidad del MX (3-Cl-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona) (Akanuma- Watanabe M *et al.*, 1997) que es un producto del cloro. En sistemas modelos acuosos, compuestos no mutagénicos, en presencia de anilina, se comportan como comutágenos (Skog *et al.*, 2000; Kulp *et al.*, 2003).

Otros compuestos mutagénicos que se encuentran con frecuencia en el ambiente acuático son las nitrosaminas (Izzotti *et al.*, 1998), que actúan de manera indirecta por sustitución de bases (Cooper y porter, 2000). Los cánceres más comúnmente producidos por estos compuestos son: gástrico, mamario, de vejiga e hígado. (Reh *et al.*, 2000; Lear *et al.*, 2001; Godschalk *et al.*, 2002; Lubet *et al.*, 2005).

También se han encontrado en residuos industriales, mutacarcinógenos en residuos de la manufactura del cuero (Clonfero, *et al* 1989), plantas de papel (Winisberg and Van der Gaag 1992), industria petroquímica abundante en metales pesados tales como: Fe, Cu, Ni, Cr, Pb y Cd, mostraron incrementar la actividad mutagénica mediante el test de Ames en cepas TA98 y TA100, con y sin activación metabólica (Vargas *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2001). Residuos químicos industriales han mostrado ser citotóxicos mediante aberraciones cromosómicas y mutagénicos mediante le test de Ames en cepas TA98, YG1021, YG1024 y YG1041. (Cerná *et al.*, 1996). Algunos desechos hospitalarios como agentes antimicrobiales tales como ciprofloxacina han mostrado ser genotóxicos mas no mutagénicos (Hartmann *et al.*, 1998; 1999) pero las drogas antineoplasicas (ifosfamida, cisplatina, doxorobucina) han mostrado ser mutagénicas mediante el cromotest SOS, el test de *E. coli* con cepa PQ37 y el test de Ames con cepas TA135, TA97 y TA102 (Jolibois *et al.*, 2003).

Otros compuestos frecuentemente desechados al agua son los ftalatos (Onodera et al., 1991), producidos por la industria del caucho (Fracasso et al., 1999) y causan abortos en ratas (Saillefait et al., 2003; 2006), esterilidad en humanos (Latini et al., 2006) y algunos han sido reportados como carcinógenos (Shea, 2003).

Los pesticidas que son ampliamente usados para producción agrícola, llegan a las aguas a través de lixiviados de zonas agrícolas (*Rehana, et al., 1995 y Rehana et al., 1996; Pollack et al., 2003*) y son acumulados en aguas subterráneas que luego llegan a fuentes abastecedoras de agua potable (*Porter et al., 1999; Thomas et al., 2001; Bolognesi, 2003*). La mutagenicidad de muchos pesticidas ha sido demostrada, tal es el caso del Glifosato y Maneb-80 ampliamente usados en Colombia (*Zuleta et al., 1990*). Es importante anotar que hay interacciones sinérgicas en cuanto a la mutagenicidad de insecticidas organofosforados con otros mutágenos aumentando así su riesgo (*Wagner et al 2003*).

En Sacramento California (USA), se ha encontrado en las aguas domiciliarias de más de un millón de habitantes, pesticidas por encima de 300 veces las dosis permitidas EWG (1999).

En Antioquia, el estudio realizado por Zuleta M y colaboradores 2001 (sin publicar) resalta que el río Negro, en su parte alta, llamada río Pantanillo, recibe las aguas negras de la población El Retiro después de que estas han sido tratadas en una planta a base de lodos activados, instalada por las EE.PP de Medellín, en el Retiro. Debe tenerse en cuenta que los mutágenos contenidos en estas aguas negras, no son retenidos o extraídos por esta planta de tratamiento.

En un estudio realizado en el laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia, se observó que las aguas que llegan a la planta de Villa Hermosa

presentan actividad mutagénica mediante el test de Ames con las cepas TA98 y TA100 con y sin activación metabólica antes y después de pasar por la planta de potabilización (Meléndez *et al.*, 2001). Además, el material orgánico (ácido húmico) que arrastran estas aguas reacciona con el cloro formando Trihalometanos y Haloacetoneitrilos, muchos de los cuales son fuertes mutacarcinógenos (García V *et al.*, 1997; Bull RJ *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997). En este mismo estudio se determinó que el agua de una planta de potabilización antioqueña, presenta alto efecto mutagénico y los mutágenos contenidos en dichas aguas alcanzaron a llegar a los domicilios, en donde se lograron identificar cuatro hidrocarburos policíclicos aromáticos altamente mutacarcinogénicos IQ, Trip-P1, Trip-P2 y MelQx, además de aldrin, heptacloro y otros pesticidas (Zuleta *et al.*, 2004). En esta planta de potabilización también se ha encontrado que la actividad mutagénica de las aguas crudas que entran a la planta, aumenta ostensiblemente después de que ha sido tratada con el coagulante sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$). Posiblemente esto se debe a que el ión Aluminio Al^{+3} desestabiliza los mutágenos unidos al material orgánico y los vuelve más activos (Duque *et al.*, 2005; Zhang y Wang 2000). Por otra parte, la gran cantidad de material orgánico que continúa en las aguas después de la coagulación, floculación y sedimentación, reacciona con el cloro formando trihalometanos y otros subproductos, muchos de los cuales son fuertes mutacarcinógenos (García *et al.*, 1997; Bull RJ *et al.*, 1995 y Xu *et al.*, 1997). Se ha demostrado que las aguas cloradas son tóxicas mediante el test con *V. fischeri*, genotóxicas mediante SOS, ensayo cometa y *S. cerevisiae* (mutabilidad mitocondrial) (Buschini *et al.*, 2004; Guzzella *et al.*, 2004; Guzzella *et al.*, 2006).

En el río Cauca, que abastece las plantas de potabilización de Cali, se encontraron altas cantidades de pesticidas organoclorados y organofosforados (Barba, 2004). En este mismo río, en épocas de alta pluviosidad, se encontraron pesticidas organoclorados como el heptacloro y el aldrín, (Parra Cardona S.P. *et al.* 1994, 1995). La mutagenicidad de pesticidas de alto uso en Colombia, ha sido

demostrada mediante el test de Ames, tal es el caso del Glifosato, Maneb-80 (Zuleta et al., 1990) y del Miral (Sierra et al., 1998). Recientemente se encontró que por exposición ocupacional al aldrín y a otros pesticidas, se produjeron mutaciones en el gen p53 de células tumorales del cerebro (Loyant et al., 2005). En estudios epidemiológicos se ha encontrado aumento del cáncer mamario en mujeres que tenían trazas del pesticida dicloro difenil cloroetano (DDE) (Olaya et al., 1998). Según Morelli (2000), más de la mitad de los pesticidas han resultado ser potencialmente carcinogénicos. Se ha encontrado que pesticidas organofosforados como el malatión y el paratión inducen tumores mamaros en ratas (Cabello et al., 2001). También se encontró que el imidacloprid y el RH-5849, que son usados desde 1992, presentaron genotoxicidad en linfocitos humanos (Feng et al., 2005).

A través de las investigaciones de Zuleta et al (2004), Meléndez et al (2001), se ha observado que la mutagenicidad directa de las aguas crudas que entran a las plantas de potabilización, es extremadamente baja en comparación con el alto efecto de mutagenicidad directa producida por el agua, después de clorada en las plantas y en los domicilios. Otros autores también han mostrado que el agua clorada causa daño oxidativo en el ADN de células humanas (Yuan et al., 2005). En muchas partes del mundo se ha demostrado la mutagenicidad del agua clorada (Sujbert et al., 2006). La mayoría de los subproductos de la cloración que se han podido identificar, son de peso molecular menor que 220g/mol, tales como los trihalometanos (THM) ej: cloroformo (CHCl₃) y bromo diclorometano (BDCM) y las furanonas ej: el MX (3 - cloro - 4 (diclorometil) - 5 hidroxil - 2 (5H) furanona) (Richardson, 1998) de tal manera que ninguna clase de filtro logra retenerlos.

Se ha encontrado que el MX es responsable de aproximadamente el 50% de la actividad mutagénica en aguas cloradas contaminadas con desechos industriales (Holmbon et al., 1981; Monarca, 2004). En relación con el origen del cáncer, varios estudios han demostrado el riesgo potencial del cáncer asociado al consumo de agua clorada (Bull et al., 1995). Los THMs causan tumor en hígado de

ratón y tumores renales en ratones machos. La formación de tumores por cloroformo, un THM, es fuertemente asociado con citotoxicidad y proliferación celular regenerativa en tejidos y se ha considerado un carcinógeno determinante. El MX es un carcinógeno viable para cualquier órgano (*Komulainen, 2004*). En estudios realizados en la Escuela de Salud pública de Harvard se ha llegado a la conclusión de que el agua clorada es la responsable de hasta el 18% de los cánceres de recto (8.000 casos) y el 9% de los de vejiga (5.000 casos) por año en los Estados Unidos (*Morris, 1995*). Debido a la exposición continua de humanos a agua potable, junto con datos epidemiológicos, químicos y ecogenotoxicológicos, sugieren una atención necesaria para examinar otras alternativas de potabilización con el fin de reducir el riesgo potencial de salud. Sin embargo, ha habido pocos estudios de la mutagenicidad de agua tratada con otras alternativas de desinfección tales como el ozono, CO₂ y clorinas (*Gauthior et al., 1989; De Marini et al., 1995; Monarca et al., 1998*), con el fin de comprender la posibilidad de reducir el riesgo de enfermedades neoplásicas.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. MUTÁGENOS Y CARCINÓGENOS ASOCIADOS A AGUAS RESIDUALES Y POTABLES.

En Colombia, la calidad del agua de consumo solo se determina teniendo en cuenta parámetros fisicoquímicos y microbiológicos (Decreto 475 de 1998), pero se desconoce por completo el control relacionado con compuestos mutacarcinogénicos, ya que los afluentes que surten las plantas de potabilización pueden recibir mutágenos por medio de la contaminación con pesticidas que en su mayoría han mostrado mutagenicidad (*Blair, 1995; Brown et al., 1990; Rehana et al., 1995; Sierra et al., 1998; Zuleta et al., 1990*). Según Withe and Rasmussen (1998), una planta de tratamiento que abastece grandes zonas urbanas en promedio distribuye a la población un total de 10^9 litros de agua por día, por lo tanto, es de gran responsabilidad utilizar un protocolo para la potabilización de las aguas. En los procesos de potabilización, la mayoría de las plantas tratan a las aguas con sulfato de aluminio y grandes cantidades de cloro (*Metcalf, 1981*), pudiendo cambiar así la conformación estructural de algunos compuestos (desechos), volviéndolos mutagénicos (*Zhang and Wang, 2000*).

Los afluentes también pueden ser contaminados con aguas negras ricas en mutacarcinógenos tales como: hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que se forman de cenizas, hollín, tiznes de humos y otros subproductos de la combustión (*Yang et al., 2003*), nitrosaminas que se encuentran en alimentos ahumados y descompuestos (*Grubbs al., 1983; Mirvish, 1975*) y aminas heterocíclicas (AH), que se generan de alimentos proteicos quemados como carnes fritas y asadas (*Felton et al., 2000*). Las AH también se excretan en la orina y heces de personas que consumen carnes fritas y asadas (*Doolittle et al., 1989; Felton y Knize, 1990;*

Frandsen, 1997; Gabbani et al., 1998; Ono et al., 1996; Randerath et al., 1999; Sousa et al., 1995; Ushiyama et al., 1991). Los desechos domiciliarios constituyen el principal contenido de las aguas negras.

Muchos de los **desechos industriales** que presentan efecto mutagénico son frecuentemente vertidos a las aguas de quebradas y ríos que luego son usados para surtir las plantas de tratamiento de las aguas para consumo humano (*Vargas et al 1993; Randerath et al 1999; Watanabe et al 2001; Watanabe et al 2003; Komulain et al 2004*). El benceno es ampliamente usado como materia prima en la síntesis de plásticos, hules, resinas, nylon, anilina, detergentes, medicamentos, colorantes e insecticidas, por lo tanto está contenido en muchos residuos industriales (*Paustenbach et al., 1993; Henderson, 1996; Whysner et al., 2004*) y está asociado con un incremento en la incidencia de leucemias y mielodisplasia e induce aneuploidías en células madre hematopoyéticas (*Travis et al., 1994; Giver et al., 2001*). Los compuestos, como los ftalatos han mostrado ser mutagénicos (*Shea et al., 2003; Fracasso et al., 1999*), entre ellos están: dibutil ftalato (DBP) y diisobutil ftalato (DiBP), son usados para mejorar el procesamiento químico de materiales plásticos, de lacas, de cauchos, cosméticos, juguetes de niños y lubricantes. Algunos ftalatos son formados por la reacción de naftaleno, que es un residuo industrial, con dióxido de titanio, que es un colorante (*García et al, 2005*). Residuos industriales como estos compuestos son vertidos en aguas de consumo (*Onodera et al., 1991*).

Las plantas de colorantes trabajan a base de arilaminas, que son compuestos mutagénicos y carcinogénicos (*IARC, 1975; European Community, 1999*) capaces de permanecer intactos por mucho tiempo en el agua, cuando son arrojados a los ríos (*Garrison and Hill, 1972; Maguire and Traez, 1991*) ó pueden ser absorbidos por los sedimentos o bioconcentrados (*Umbuzeiro et al., 2004; Jäger et al., 2004., Mathur, 2005*). El solvente industrial percloroetil (PERC) es ampliamente usado para remover grasa durante los procesos industriales y se ha comprobado

que aumenta la incidencia de adenoma renal, adenocarcinoma, leucemia y tumores hepatocelulares (*Toraason et al, 2003*). Los aceites quemados de las maquinarias industriales y de automotores pueden contener hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que son compuestos mutacarcinogénicos (*White 2002; Alguacil et al 2002*). Los benzotriazoles, tales como 2-fenil-benzotriazol, son productos de la industria de colorantes, pesticidas y caucho y se ha observado que inducen una alta mutagenicidad (*Watanabe et a., 2002*).

La formación de mutacarcinógenos durante el proceso de la **cloración** del agua, se debe a que el cloro es altamente reactivo, lo que favorece su interacción con numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos (*Fallon and Fliermans, 1980; Maruoka and Yamanaka, 1985; Monarca, 1998; Zuleta y Meléndez 2001; Yuan, 2005*). La formación de mutacarcinógenos por acción del cloro depende del pH, la temperatura, consumo de cloro (*Kavanough et al 1980; Garcia-Villanova et al, 1997*), cantidad de carbón orgánico total (TOC) y de la presencia de compuestos inorgánicos como el bromo que contribuye a la producción de organoclorados bromados, así como trihalometanos (THMs), que en este caso, producen mutagenicidad de manera exponencial (*Nobokawa, 2001*). Estos productos de desinfección pueden estar presentes en el agua como mezclas complejas. Entre los mutágenos más potentes formados por la reacción del cloro con los ácidos húmicos y fúlvicos del material orgánico, están las clorofuranonas (THMs) como el MX (3-Cloro-4-diclorometil)-5-hidroxi-2-(5H)-furanona), el MA (3-4-(dicloro)-5-hidroxi-2-(5H) furanona) (*Meier et al., 1987*), el E-MX que es un isómero de forma abierta del MX, el bromohidroxifuranona (BrMX) e hidrocarburos clorinados (*Badawi et al.,2002; Fielding y Horth,1986; Kronberg y Franzen,1993; Le Curieux et al.,1999; Meléndez et al.,2001; Nobokawa y Sanukida,2001*).

Las aguas negras, procedentes de domicilios, hospitales, fabricas, estaciones de gasolina, e.t.c contienen aminas heterocíclicas (AHs), con alta potencialidad mutacarcinogénica. Dichas aminas se forman en la costra quemada de alimentos

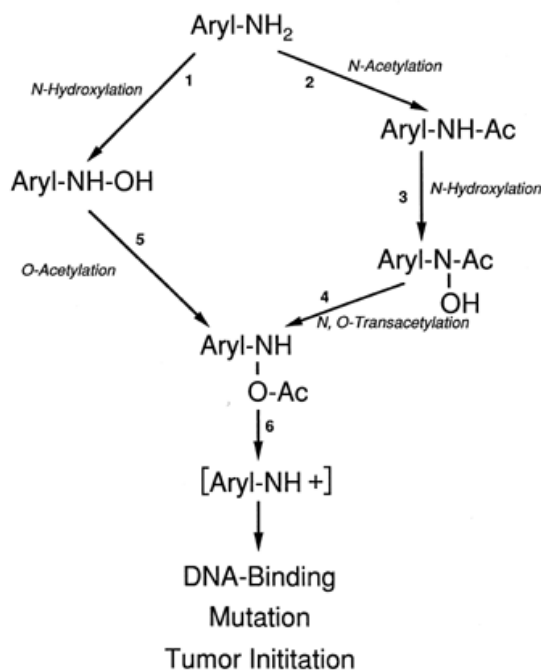
proteicos ricos en creatina, como carnes, pescado fritos y asados (*Pfau et al., 2006*). Entre las AHs están las amino-imidazo azarenas (AIA) que han demostrado ser potentes mutágenos en ensayos microbiales y en estudios de oncología. Los niveles de producción de los AIA en la costra quemada, varían en bajos rangos de p.p.b, dependiendo del tiempo de calor y temperatura, pero también son influenciados por el contenido de agua, proporción de aminoácidos y tipo de carne (*Skog et al, 1998; Knize and Felton, 2005*).

En general, las aminas heterocíclicas pueden dividirse en dos grupos: aminas polares que contienen el anillo imidazo y las aminas no polares que tienen en común una molécula Piridoindol o Dipiridoimidazol. La mayoría de aminas heterocíclicas son formadas de la mezcla creatinina, aminoácidos y carbohidratos, expuesta a altas temperaturas (*Murkovic M et al., 2004*).

Estas AHs, ya sea en forma libre o en mezclas complejas, llegan a las aguas negras por medio de la orina y heces fecales de personas que consumen dichos alimentos (*Viberg et al, 2006*).

La mayoría de estas AHs requieren activación metabólica por CYP450 (ver figura 1) (*Inami and Mochizuki, 2002*), para producir cambios fundamentales por la bioquímica de la célula y así formar aductos con el ADN (*Zhu et al., 2000*).

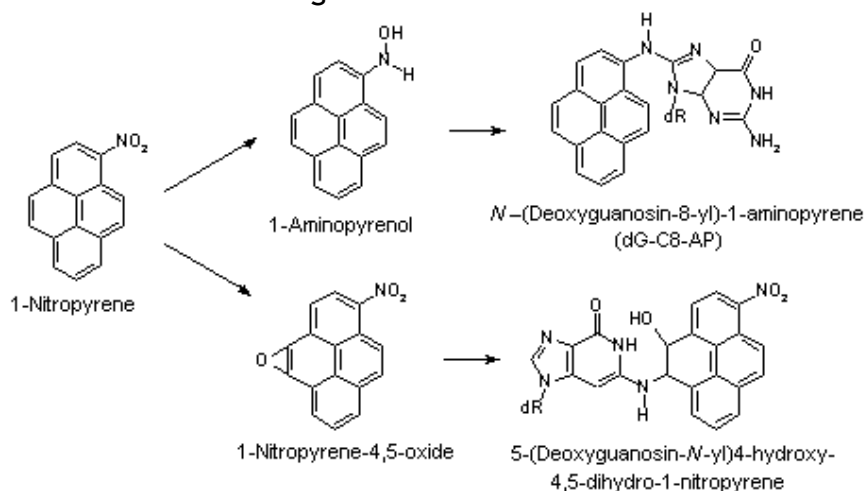
Figura 1. Mecanismo de activación de aminas heterocíclicas (Arlaminas) por metabolismo para inducir mutación. Tomado de Meyer (1994).



Las aguas negras también contienen hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que en su mayoría son también mutacarcinogénicos, por ejemplo el benzo a pireno. Los HPA carcinogénicos se forman por combustión incompleta y pirolisis de material orgánico, por lo tanto se encuentran en el humo, cenizas (*Dipper y Bigger, 1991; Nagao y Sugimura, 2000; Marston et al., 2001; Yang et al., 2003*), hollín y aceites quemados que son vertidos en el agua (*Lawther et al., 1965; Urano, 1998; Philips et al., 1999; De la Cruz y Huaman, 2002*) ó también por procesos atmosféricos se pueden volver mutagénicos, como por ejemplo: reacciones entre varios HPA no mutagénicos y óxidos de nitrógeno (*Pitts et al., 1978*). Los mutágenos del humo también llegan a las quebradas y ríos al ser arrastrados por el viento y precipitado a las aguas a través de la lluvia. La mayoría de los HPAs también son premutágenos indirectos que requieren oxidación por citocromo p450 para ser convertido en forma activa y tener efecto carcinogénico (*Inami and Mochizuki, 2002; Hakura et al., 2003*) (ver figura 2).

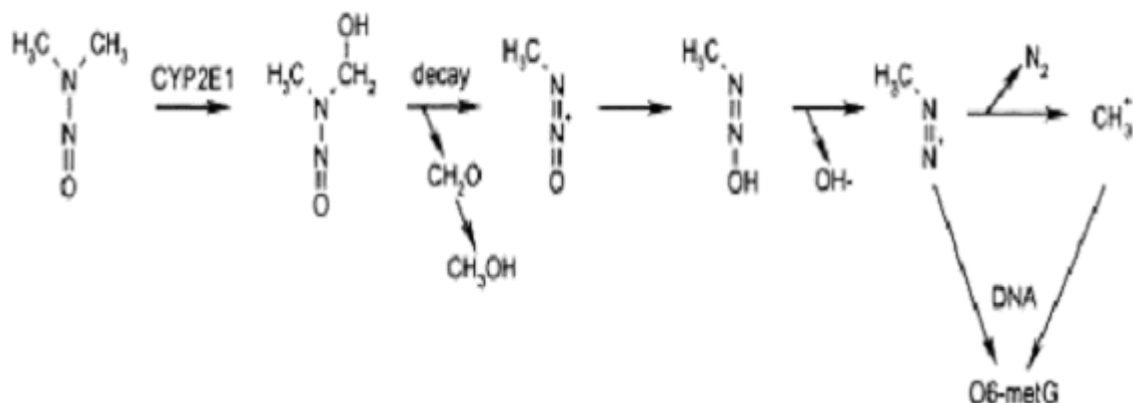
También existen HPA's que pueden transformarse en mutágenos directos por fotoreactivación en los cuerpos de agua (Yan *et al.*, 2004).

Figura 2. Mecanismo de acción del nitropireno, un hidrocarburo policíclico aromático, que después de ser activado por metabolismo, forma aducto con la guanina del DNA. WWW.intox.org.



Otros mutacarcinógenos incluidos en todo tipo de humo son las nitrosaminas que se pueden formar durante la combustión con la participación de ácidos nitrosos y óxidos de nitrógeno (Scalan *et al.*, 1983; De Flora *et al.*, 1995; Izzotti *et al.*, 1998). Las nitrosaminas son comúnmente metabolizadas por CYP2E1 ó CYP2A6 por hidroxilación del carbono alfa. Los productos intermedios, muy reactivos, son alquidiazonio e iones de carbono, estos agentes alquilantes reaccionan preferiblemente con el O⁶ de la guanina (Guttenplan *et al.*, 1982) (Ver figura 3). El daño metilado en el ADN concluye con una mutación por sustitución de bases G:C --- A:T, iniciando así la carcinogénesis (Horsfall *et al.* 1990). La mayoría de las nitrosaminas estudiadas (aproximadamente 96%) han demostrado ser fuertes mutacarcinógenos (Spreghalder *et al.*, 1980; Mitacek *et al.*, 1999; Godoy *et al.*, 2002; Hamed *et al.*, 2004).

Figura 3. metabolismo de dimetilnitrosamina mediante CYP2E1 ,
Cooper y Porter (2000)



5.2. RETENCIÓN DEL MATERIAL ORGÁNICO DEL AGUA MEDIANTE RESINAS MACRORETICULARES AMBERLITA XAD (Rom and Haas, Philadelphia, pa.).

Viene en aumento el reporte del uso del método analítico que usan resinas de polímeros porosos como retenedor de los compuestos orgánicos de muestras de río, aguas saladas, aguas negras, y de medios biológicos acuosos (*kun y Kunin, 1965; Bradlow, 1968; Gustafson et al., 1968; Riley y Taylor, 1969; Burnham et al., 1972; Kennedy, 1973; Stepan et al., 1978; Dolara et al., 1981; Noordsij et al., 1983; Maruoka et al., 1985; Daignault et al., 1988; Kool et al., 1989; Guzzella and Sora, 1998; Guzzella et al., 2002; Siddiqui y Ahmad, 2003; Kutlu et al., 2004; Umbuzeiro et al., 2004; Zuleta et al., 2004; Subjert et al., 2006*). El método más usado es la resina XAD, esta es un copolímero de estireno-divenilbenzeno de baja polaridad que posee características macroreticulares (*kun y Kunin, 1965; Zaika et al., 1968*), esenciales para su alta capacidad de adsorción de químicos polares y apolares potencialmente efectivos en pruebas tóxicas y genotóxicas (*Sloof et al., 1983*).

El éxito analítico con material inorgánico y microorganismos es contrastado con la carencia de químicos para cuantificar e identificar los componentes químicos orgánicos del agua. Desde 1970 hasta 1976, solo 66 compuestos químicos orgánicos han sido positivamente identificados en agua cruda en el mundo (EPA,

1970), de estos, solo 10 se han detectado en aguas potables. Recientes investigaciones han elevado el número total de compuestos químicos identificados en agua potable a más o menos 300 (Junk y Svec, 1973). Estos hallazgos obligaron a desarrollar tecnologías que permitieran la recuperación e identificación de compuestos químicos en aguas y el más eficiente fue la absorción por resinas XAD (Junk, 1974). Con XAD se pueden detectar compuestos poco volátiles y contaminantes lipofílicos en aguas, esto se debe a sus propiedades que le dan una alta capacidad de adsorción. La retención eficiente de pesticidas (Kennedy, 1973; Riley y Taylor, 1969), aminoácidos (Riley y Taylor, 1969), ácidos alifáticos (Riley y Taylor, 1969; Gustafson et al, 1968), y componentes misceláneos individuales (Burnham et al, 1972; Riley y Taylor, 1969), del agua, usando XAD. Resultados similares para alcaloides (Fujimoto y Wang, 1970; Weissman et al, 1971), abuso de drogas (Weissman et al, 1971; Finke, 1972), en medios biológicos acuosos, han sido también publicados. Estos resultados sugieren que las resinas XAD tienen una amplia aplicabilidad para retener una amplia gama de componentes orgánicos presentes en una matriz acuosa. Se recomienda en un estudio de identificación de compuestos en aguas, aplicar la retención con resinas XAD para el análisis preciso de contaminantes orgánicos presentes en bajos niveles en agua cruda y agua potable (Junk et al, 1974). En la evaluación de 83 químicos disueltos en agua las resinas demostraron recuperar el 91% del peso promedio de los químicos orgánicos (Junk et al, 1974)

Las resinas XAD2 y XAD7 o SIR (Resinas Impregnadas con Solventes), para ser ideales deben tener buena movilidad del líquido complejo en la fase resina, buena movilidad del metal entre fase acuosa y resina, alta afinidad, alta selectividad iónica, alta estabilidad física y química y baja pérdida de extractos. Los macroporos poliméricos tienen estructura en 3D rígida que les permite incorporar grandes cantidades de extracto debido a la gran especificidad del área, las resinas XAD7 son alifáticas metil- acriladas (moderadamente hidrofílica) y XAD2 es hidrofóbica. En una escala de polaridad, las resinas se clasifican como poco o no polares.

Cuadro 1. Características de las Resinas XAD2

Funcionalidad	Estireno dibenilbenzeno (no polar)
Área de la superficie	300 m ² /g
Promedio del tamaño del poro	90 Å
Forma	Pequeñas esferas lisas
Diámetro	40-60 maya (~0.5 - 0.25 mm)
Color	Blanco

El siguiente método con resinas XAD2 y XAD7 mostró ser muy eficiente para estudios con aguas potables municipales (Burnham et al, 1972; Junk et al, 1974) y agua cruda contaminada (Junk et al, 1974). El primer paso en la adsorción química es pasar de 1 a 100 litros de agua a través de columnas de vidrio que contengan aproximadamente 20g de XAD2 y 20g de XAD7. Los compuestos químicos orgánicos adsorbidos por las resinas XAD son eluidos de las resinas con 3 volúmenes ($\pi \times r^2 \times \text{altura de columna} \times 3 \text{ veces}$) de dietil éter, acetona y metanol. El agua residual que queda en la columna se remueve y, junto a los tres eluyentes, se rotavapora hasta la sequedad (Junk et al, 1976), y los extractos se procesan para los diferentes análisis de mutagenicidad, genotoxicidad e identificación por GC/MS.

5.3 TEST DE AMES

Según la literatura, más de 5000 químicos han sido ensayados mediante el test de *Salmonella*, (Maron y Ames, 1983). Este test también se ha usado para determinar la mutagenicidad de mezclas complejas ambientales y biológicas. Muchos de los mutágenos que primero se detectaron mediante el test de *salmonella*, subsecuentemente mostraron ser carcinogénicos en test con animales (NCI Bioassays, 1978^a, 1978^b, 1979^a, 1979^b; Ohgake et al., 1982; Sugimura, 1982).

El test de *Salmonella* fue el primero en validarse gracias a un estudio de 300 químicos, muchos de los cuales eran reconocidos carcinógenos (*McCann et al., 1975 a; McCann y Ames. 1976; McCann y Ames. 1977*). Esto subsecuentemente se validó en estudios de: Imperia Chemical Industries (*Purchase et al., 1976*), The National Cancer Center Research Institute in Tokio (*Sugimura et al., 1976*) y The International Agency for Research on Cancer (*Bartsch et al., 1980*).

Todas las validaciones mostraron que el test fallaba en la detección de actividad mutagénica en unos pocos carcinógenos como los pesticidas policlorados (*Rinkus y Legator, 1979. 1981; Ames y McCann, 1981*). Muchos de los carcinógenos que mostraron ser negativos en un principio, mostraron efecto mutagénico mediante la adición de los cofactores de la mezcla S-9.

Cada cepa tiene un tipo diferente de mutación en el operón de histidina, que regula los requerimientos de histidina, sumado a otras mutaciones que incrementan su afinidad para detectar mutágenos. Una mutación (*rfa*) provoca una pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que cubre la superficie de la bacteria e incrementa la permeabilidad para grandes moléculas como el benzo(a)pireno, que normalmente no penetra la membrana celular de esta bacteria (*Ames et al., 1973*). La otra mutación (*uvrB*) es una delección del gen que codifica para el sistema de reparación del ADN por escisión de bases, resultando un incremento notable en la sensibilidad para detectar mutágenos (*Ames. 1973*). La delección del gen *uvrB* se extiende a través del gen *bio* y, como una consecuencia, la bacteria también requiere Biotina para crecer.

Las cepas estándar para el test: TA97, TA98, TA100 y TA102 contienen el plásmido Factor R (*pKM101*) que incrementa la mutagénesis química y espontánea para auspiciar un error en el sistema de reparación del ADN (*McCann et al., 1975b; Walker y Dobson. 1979; Shanabruch y Walter. 1980*).

La mutación hisG46 en TA100 con factor R y TA1535 es en el gen hisG que codifica para el primer enzima de la biosíntesis de Histidina (Ames, 1973). Esta mutación, determinada por el análisis de secuencia del ADN, sustituye -GGG-CCC-(Prolina) por -GAG-CTC- (Leucina) en el organismo silvestre (*Barnes et al*, 1982).

La mutación hisD3052 en TA1538 y TA98 es en el gen hisD que codifica para histidinol dehidrogenasa. TA1538 y su derivado TA98, que tiene el factor R, detecta varios mutágenos que inducen corrimiento del marco de lectura. Pueden estabilizar los pares corridos que usualmente ocurren en secuencias repetitivas o *hot spots* del ADN, resultando una mutación por corrimiento en el marco de lectura, que restaura el correcto marco de lectura para la síntesis de histidina.

De este modo las colonias observadas solo son las revertantes (fig. 4)

Figura 4. Fotografía real de un resultado de ensayo de *Salmonella typhimurium*. Se observan claramente las colonias revertantes. WWW.hydrotox.de.



5.3.1. Activación metabólica con la fracción microsomal de hígado de rata (S-9)

En una discusión para la validación del test de Ames se estima una correlación entre carcinogenicidad y mutagénesis, algunos carcinógenos que fueron reportados negativos pueden ser positivos para mutagénesis, usando en los ensayos los cofactores de la mezcla S-9 (Rinkus and Legator, 1979, 1981; Ames and McCann, 1981)

5.4. ENSAYO COMETA

En las ultimas dos décadas, la investigación para nuevas metodologías que permitían medir daño en el ADN, se desarrollaron gracias a Rydberg y Johanson, quienes fueron los primeros en cuantificar directamente el daño en el ADN en células individuales; Luego, Ostling y Johanson desarrollaron la técnica de electroforesis en microgel conocida como Ensayo Cometa, la cual es una técnica relativamente simple, rápida y flexible, para medir cualitativa y cuantitativamente el daño del ADN de células individuales vegetales o animales, y de pequeñas muestras de tejidos expuestos a agentes físicos o químicos (Collins,A.R.,2004; Fairbairn et al.,1995; Kelvey-Martin et al.,1993; Tice et al., 2000). Muchos compuestos han sido investigados y evaluados mediante el ensayo Cometa, entre estos se encuentran: Agroquímicos, pesticidas, aditivos de comida, nitrosaminas, drogas anticáncer, metales pesados y químicos industriales (Brendler-Schwaab et al., 2005; Rojas et al., 1999)

Desde el desarrollo del método en gel de electroforesis de una sola célula en medio alcalino, por (Singh et al., 1988), este ha sido ampliamente usado en las investigaciones, en el rango de biomonitoreo ambiental, para diagnóstico clínico y así entender los procesos de reparación y la toxicología genética (Tice et al., 2000; Sun et al., 2005; Li et al., 2006). Esta técnica es capaz de detectar quiebres en una sola hebra de ADN, quiebres de cadena doble de ADN y sitios

lábilis al álcali en células individuales, a consecuencia de la acción de compuestos genotóxicos y/o mutagénicos (Rojas et al., 1999).

En el ensayo Cometa, las células incrustadas en microgel de agarosa, después de haber sido incubadas por una hora con el tratamiento, ya sea con rayos X o H₂O₂, son sometidas a solución de lisis con detergentes (Extran) y sales concentradas, con el fin de eliminar membranas celulares, excepto material nuclear.

Posteriormente, en 1988 Singh et al., utilizó la misma técnica pero bajo condiciones alcalinas (pH>13), capaz de detectar quiebres de cadena simple asociados con sitios de reparación por escisión incompleta y sitios lábilis al álcali, porque la mayoría de los agentes genotóxicos inducen en orden de magnitud más quiebres de cadena simple y/o sitios lábilis al álcali, que sitios de cadena doble. Esta versión del ensayo es más versátil y ofrece un incremento en la sensibilidad para identificar agentes genotóxicos. Dos años después Olive et al., 1990, introdujo otra versión alcalina de este ensayo, en el cual el ADN es electroforizado a pH 12.3, permitiendo solamente detectar quiebres de cadena simple y sitios de reparación incompleta.

Se utiliza una solución de electroforesis alcalina (pH>13), con el fin de que el ADN fragmentado, por medio de una corriente eléctrica, se desplace hacia el ánodo, dando así una apariencia de un cometa. Finalmente el cometa es teñido con bromuro de etidio, para ser visto por luz fluorescente (fig 5).

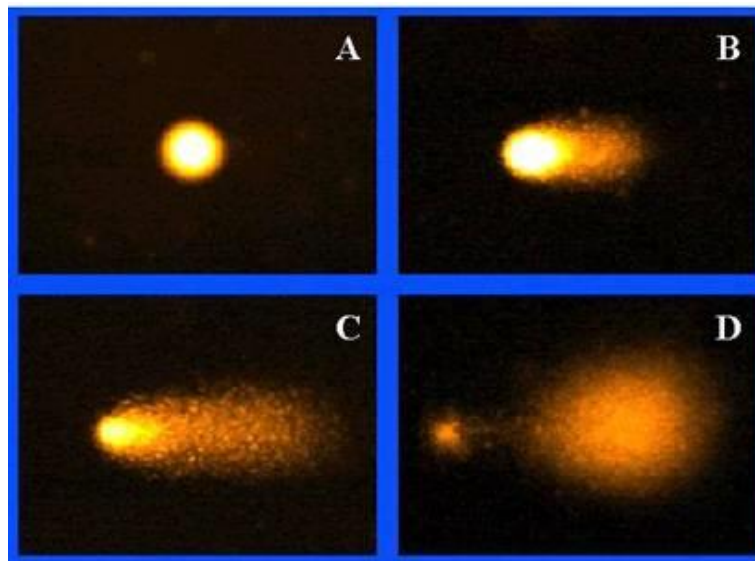
El daño del ADN ocasionado por el compuesto evaluado, se interpreta dependiendo de la longitud de la cola. Esto significa que a mayor longitud de cola, mayor daño de ADN.

Los linfocitos humanos son un buen material para las investigaciones sobre la toxicidad de contaminantes orgánicos presentes en las aguas, los resultados que aportan los linfocitos pueden demostrar los efectos adversos de los

contaminantes sobre los humanos, y podría ser usado para predecir el riesgo sobre la salud humana (Li Yi et al., 2006).

Desde la introducción de ensayo Cometa en la toxicología genética, se ha incrementado el número de investigadores que aplican esta técnica. Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, las ventajas de la técnica incluyen: 1) alta sensibilidad para detectar bajos niveles de daño en el ADN. 2) requiere de un pequeño número de células por muestra. 3) es flexible. 4) es económico. 5) es un proceso rápido y fácil de aplicar. 6) los experimentos se llevan a cabo en poco tiempo. 7) se ajusta a cualquier célula eucariota (Tice et al., 2000).

Figura 5. Fotografía tomada en un microscopio de fluorescencia en 40X. Se observan las células dañadas (cometa), debido a la tinción con bromuro de etidio. WWW.Ueb.cz.



5.5. RIESGO DE LOS MUTÁGENOS.

Los mutágenos son compuestos que al interactuar con el ADN causan daño en la estructura molecular de los genes y dicho daño se puede convertir en mutación. La mutación altera el funcionamiento del gen y este mal funcionamiento da

origen a enfermedades, como el cáncer. Es importante saber que las mutaciones que ocurren en el material genético (ADN) de una célula, pasan a las demás células hijas. Se ha comprobado que las células se tornan cancerosas cuando en ellas se acumulan mutaciones que dañan genes comprometidos en regular la proliferación celular, tal es el caso de los proto-oncogenes y genes supresores de tumores, los cuales trabajan en acción concertada para evitar los tumores. Las alteraciones de proto-oncogenes, los convierten en oncogenes que estimulan la proliferación celular, y las mutaciones en genes supresores de tumores conllevan a la transformación neoplásica (*Bishop. 1999; Levine, 1993; LaRue. et al., 2000; Robert et al., 2000; Díaz R. et al., 2004; Sung J. et al., 2005*).

Uno de los oncogenes mas estudiados es el ras (H-ras, K- ras, N-ras), el cual, al sufrir mutación en uno de los codones 12, 13 ó 61, le acarrea la perdida de la función GTP-asa, esencial para regular la proliferación celular. (*Shi E. et al., 1999; Kampman et al., 2000*). Las mutaciones en el oncogen K-ras están presentes en el 50% de los cánceres coló-rectales, 75-90% de cánceres pancreáticos, 30% de adenocarcinomas de pulmón y 20-25% de cánceres endometriales (*Bos et al., 1989; Tachino et al., 1995; Bautista et al., 1997; Andreyev et al., 1998*). Otras mutaciones que contribuyen a la iniciación del cáncer son las que dañan genes supresores de tumores como el p53. Este gen se encuentra mutado en casi la mitad de todos los cánceres humanos (*Levine et al., 1991; Harris et al., 1993; Hussain et al., 1998; Voskuil et al., 1999; Venkatachalan et al., 1998; Prives et al., 1999; Hall et al., 2000; Irwin et al., 2000; Felser et al., 2000*).

Otras mutaciones que contribuyen al desarrollo de neoplasias son las que alteran enzimas asociadas con el proceso de detoxificación de los mutágenos tales como glutation -S-transferasa (*Bell et al., 1992; Nakajima et al., 1995*) y algunas isoenzimas citocromo p450 (*Kato et al., 1992; Oyama et al., 1997; Hayashi et al., 1991*). Las alteraciones en proteínas involucradas en la reparación del ADN y

replicación del ADN pueden contribuir a la carcinogénesis al inducir inestabilidad genómica (*Hartwell et al., 1994; Nyberg et al., 2002*).

También es muy importante saber que si las mutaciones se acumulan en células germinales, se incrementan las enfermedades hereditarias (*Poirier and Beland, 1992, 1994*), pero si se acumulan en células somáticas se inicia el cáncer.

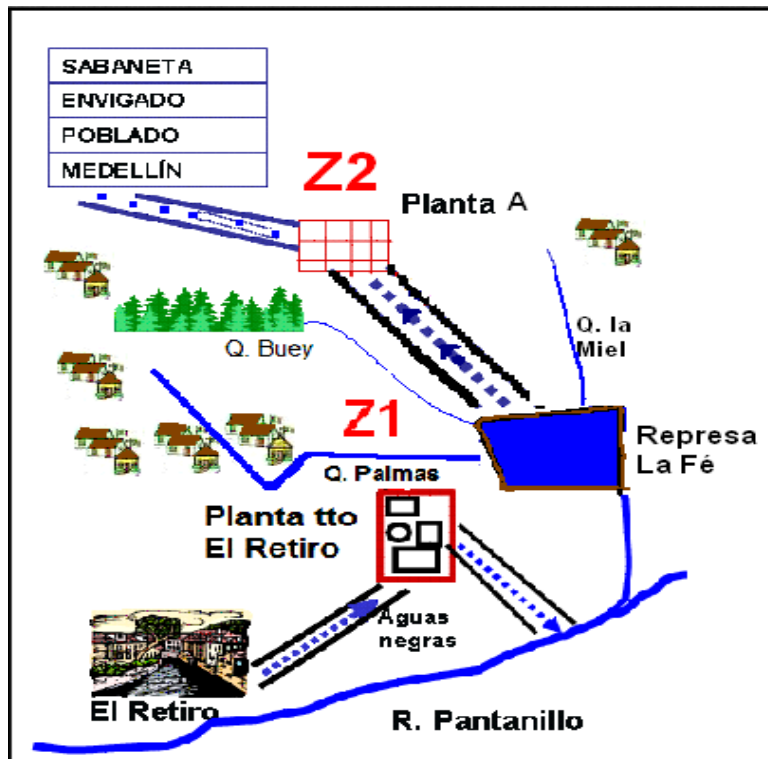
6. METODOLOGÍA

6.1 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de aguas se obtuvieron de dos zonas: Z1: quebrada Las Palmas cerca a su desembocadura en la represa la Fe. Z2: agua (cruda) al entrar a la planta "A" (fig 6).

Cada muestra se tomó en tres ocasiones diferentes en los mismos sitios. El volumen total colectado de cada muestra fue de 100 litros y se colectó de acuerdo a lo recomendado para el análisis de aguas (*Standard Methods for the examination of water and Wastewater, 1985*).

Figura 6. Área geográfica de las aguas en objeto de estudio



6.2 CONCENTRACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL MATERIAL ORGÁNICO DEL AGUA

Las muestras de agua se neutralizaron a pH 7, se filtraron en papel watman #1 y luego se procedió a concentrar el material orgánico de cada muestra de agua. Una de las muestras de 100L de agua, se pasó por columnas que contienen 100 gramos de resina XAD-7 y 100 gramos de resina XAD-2, a una velocidad aproximada de 15 ml/min. La elusión se hizo con 4 volúmenes de acetona seguida de tres volúmenes de dietil éter. Los solventes se retiraron por rota evaporación a baja presión y 50°C hasta alcanzar la sequedad para poder pesarlos y etiquetarlos. Antes de usar las resinas XAD, estas se lavaron consecutivamente cada 24 horas por 3 días, con metanol, acetona y metanol. En el momento de usar la resina XAD, se enjuagó tres veces con agua destilada. En la parte inferior y superior de la columna se colocó algodón que también se lavó con metanol. Las dosis que se trabajaron se sacaron diluyendo 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 y 3 mg de extracto en un mililitro de DMSO al 50%.

Por otro lado, se concentró el material orgánico de 100 L de muestra de agua de Las Palmas (mediante destilación por película ascendente), con el fin de determinar cual de los dos procedimientos (resinas y destilación) es más eficiente para retener mutágenos de aguas. Esta comparación se realizó mediante el test de Ames con las cepas TA98 y TA100, con y sin activación metabólica, únicamente con la dosis de 3mg de extracto de agua de Las Palmas en un mililitro de DMSO al 50%, en un experimento por triplicado. También se comparó la cantidad de extracto obtenido por los dos métodos.

Con la colaboración de los estudiantes del Grupo de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia y de los doctores Iván Meléndez y Carlos López de la Universidad de Antioquia, se logró hacer la identificación de mutágenos por análisis en cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS). Las muestras provenientes del agua de Las Palmas y del agua cruda al entrar a la planta "A", se derivatizaron con 500µl de trifloruro de boro (BF₃) en metanol al

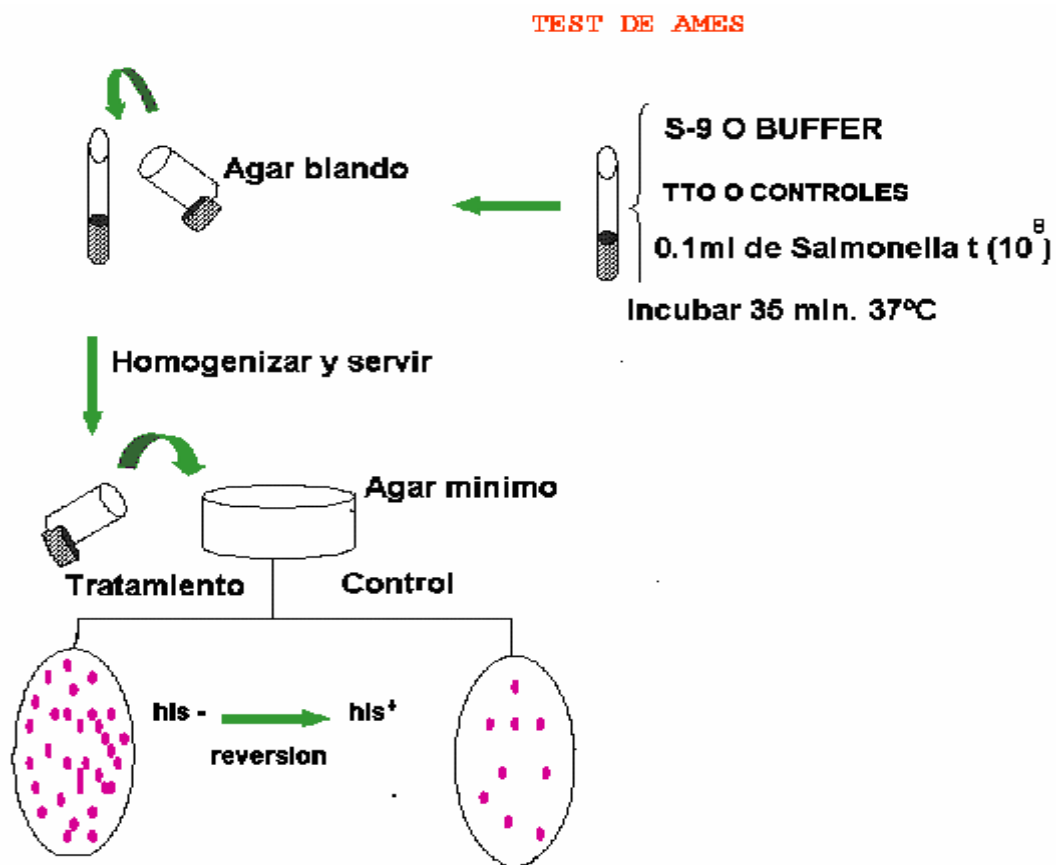
12% durante 12 horas, a 100°C, luego se extrajo dos veces con 500 µl de hexano, del cual se extraen 5µl para inyectarlos en el cromatógrafo. La muestra se inyectó directamente en un sistema integrado GC/MS, Cromatógrafo de gases modelo 3800 marca Varian; intector Split/Splitless, sistema de inyección automática de muestras marca Varian Modelo 8200; Detector de masas Saturno 2000, con trampa de iones. Columna DB -5 MS (Polidimetil Siloxano con 5 % de Fenilo) de 30m x 0.25mm de ID x 0.25µm de espesor de película. Las condiciones de operación: Gas Portador: Helio (1 ml/min), modo Flujo constante. Temperatura del Inyector: 270 °C. Programación del Horno: Temperatura inicial 100 °C (durante 3 minutos), sube a una rata de 4 °C/min hasta 280 °C. Condiciones del Detector: Temperatura de la trampa, 250 °C, manifold 70 °C, temperatura de la línea de transferencia a 270 °C. Espectros a 70 eV. Inyección Splitless, 3 µl, Valvula Split on a los 30s.

6.3 DETECCIÓN DE POTENCIALIDAD MUTAGÉNICA POR EL TEST DE AMES

El efecto mutagénico de los extractos del material orgánico del agua obtenidos por resinas se evaluó por medio del test de Ames, usando el protocolo descrito por *Maron y Ames, (1983)*. Se trabajó con dos cepas de *Salmonella typhimurium*, la TA-98 y la TA-100. De cada extracto se evaluó la mutagenicidad de dosis que no hayan sido tóxicas o solo lleguen a LD₁₀, en cada muestra se trataron 10⁷ bacterias, en presencia o ausencia de enzimas activadoras contenidas en un homogenizado de hígado (mezcla S9) de rata macho, con el fin de activar algunos mutágenos indirectos de manera metabólica. La muestra se preincubó a 37°C por una hora y luego se siembra en agar mínimo. El conteo de colonias se hará luego de 48 horas. Para el control positivo se utilizó 2-aminofluoreno (2-AF) el cual es un mutágeno indirecto que necesita activación metabólica (S9) para producir acción mutagénica. Como control negativo se usó agua desionizada y bi-distilada. Esta agua se sometió al mismo proceso realizado con las muestras. También se usó como control negativo el solvente DMSO al 7%. Para cuantificar la mutagenicidad se determinó el índice mutagénico (IM). Este índice se refiere a

las veces que el número de mutaciones producidas por el tratamiento contiene las mutaciones del control negativo o sea las mutaciones espontáneas. Se catalogó como respuesta positiva, cuando la mutagenicidad del tratamiento sea dos veces mayor que la del solvente (equivalente a 3IM). Este concepto ha sido usado por muchos autores (*Carrero et al., 2000; Ohe et al., 2003*). Se considera mutagenicidad débil cuando el número de mutaciones de la muestra es más de dos veces la mutagenicidad del solvente (2IM), pero no alcanza a tres veces. Los resultados de cada dosis se expresó como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Ver figura 7.

Figura 7. Protocolo ilustrativo para llevar a cabo el test de Ames.



6.3.1. Inducción de enzimas de hígado de rata.

Se utilizó el homogenizado de hígado de Ratas (*Ratus ratus*) macho con un peso aproximado de 200 g inducidas con Aroclor 1254., este es diluido en aceite de maíz a una concentración de 200mg/ml y se le administra a las ratas mediante una inyección intraperitoneal de 500mg/Kg, cinco días antes del sacrificio. Las ratas se alimentan con agua y purina hasta 24 horas antes del sacrificio. Al quinto día de la inducción, las ratas se sacrifican para su procesamiento.

6.3.2. Procesamiento.

Matar el animal por dislocación cervical y colocarlo boca arriba en una tabla de autopsia. Asegúrelo de los pies con alfileres. Aplicar completamente por toda la piel etanol al 70% o tintura de yodo. Cortar la piel usando tijeras afiladas estériles o escarpelo. Si la piel está levantada de las capas subyacentes, la incisión puede ser hecha sin cortar el músculo. Doblar la piel hacia atrás y pegarla con los alfileres a la tabla de autopsia para evitar entrar en la piel de la cavidad abdominal. Impregne la capa muscular con etanol y luego corte a través de esta capa con un par de tijeras estériles o escarpelo teniendo cuidado de no cortar dentro del esófago o intestinos para no contaminar el homogenizado de hígado.

6.3.3. Preparación de la fracción S-9 del homogenizado de hígado.

La preparación de la fracción S-9 de hígado está basado en el procedimiento de Garner et al., (1972). Todos los pasos del procedimiento son realizados de 0-4 °C utilizando hielo, soluciones estériles y recipientes de vidrio. Los hígados frescos son ubicados en beakers antes pesados conteniendo aproximadamente 1 ml de KCL frío al 0.15 M por gramos de hígado. Un hígado de rata pesa aproximadamente 10-15 gramos. Después de pesar los hígados se lavan varias veces con KCL frío. Lavados sucesivos con KCL son esenciales para asegurar una

preparación estéril y para remover la hemoglobina, la cual puede inhibir la actividad de las enzimas del citocromo P450. Los hígados lavados son transferidos a un beaker que contenga 3 ml de KCL al 0.15 M por gramo de peso de hígado, y son desmenuzados con tijeras estériles, y homogenizados en un aparato para macerar (Elvehjem) con teflón o con un homogenizador de polytron. El homogenizado es centrifugado por 10 min a 9000 g, y el sobrenadante (de la fracción S-9), es decantado y almacenado. La esterilidad de la preparación es determinada por la siembra de 0.01 ml de agar mínimo conteniendo histidina y biotina. 1 ml de la fracción S-9 contiene aproximadamente 250 mg de microsomas por peso de hígado. Las concentraciones de proteína son aproximadamente 40 mg/ml determinada por el procedimiento de Lowry et al., 1951, y son constantes de un grupo al siguiente. La preparación fresca de S-9 es distribuida en porciones de 1-2 ml en pequeños tubos Nunc de plástico. Rápidamente son enfriados en una cama hielo seco comprimiéndolos, y almacenados inmediatamente a -80 °C. El S-9 requerido para los ensayos es derretido a temperatura ambiente y ubicado en un recipiente con hielo seco. La mezcla de S-9 se debe hacer pronto. La esterilidad de la mezcla de S-9 esta determinada por la adición de 0.5 ml de top agar en cajas de petri con agar glucosa mínimo. Aunque es posible remover muchos contaminantes por filtración de la mezcla de S-9 a través de un filtro de 0.40 μ , este procedimiento introduce el riesgo de la perdida de enzimas, particularmente si hay espuma. No es necesario filtrar la mezcla S-9 si los hígados son removidos bajo condiciones de asepsia.

6.3.4. Estabilidad de las fracciones de S-9 congeladas.

No se ha determinado cuanto tiempo pueden permanecer activas las enzimas microsomas a -80 °C pero no se ha encontrado pérdida apreciable de la actividad para 2- aminofluoreno o para benzo(a) pireno en preparaciones que han sido almacenadas por 2 años a esta temperatura.

6.3.5. Recomendaciones para S-9.

Para óptima mutagénesis, la concentración de S-9 por plato es crítica, y puede ser variable de un compuesto a otro. Demasiado S-9 o muy poco puede disminuir drásticamente la respuesta mutagénica. Evaluaciones rutinarias determinan las condiciones óptimas para mutagénesis con cada compuesto en particular. Se han evaluado preparaciones de S-9 con varios compuestos, como Benzo(a)pireno. O 7,12 dimetilbenzo(a) antraceno y aminas aromáticas tales como: 2-acetilaminofluoreno o 2-aminofluoreno para encontrar la cantidad óptima de S-9. Se encontró que benzo(a) pireno y 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno dan una respuesta mínima con S-9 no inducido, lo cual los hace útiles como indicadores de eficiencia para la inducción de S-9.

Se recomienda una concentración de 20 µl de S-9 por plato. Para esta concentración, la mezcla de S-9 debe contener 0,04 ml de fracción S-9 por ml de mezcla.

6.3.6. Mezcla de S-9.

Los componentes de la mezcla estándar de S-9 son 8mM de MgCl₂, 33mM KCl, 5mM de glucosa-6-fosfato, 4mM de NADP, 100mM de fosfato de sodio, pH 7.4 y S-9 en una concentración de 0.04 ml por ml de mezcla. La mezcla de S-9 es preparada en frío para cada ensayo de mutagenicidad para evitar que se pierda la actividad

6.4 DETECCIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR ENSAYO COMETA Y EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD (VIABILIDAD CELULAR) MEDIANTE COLORACIÓN CON AZUL DE TRIPANO

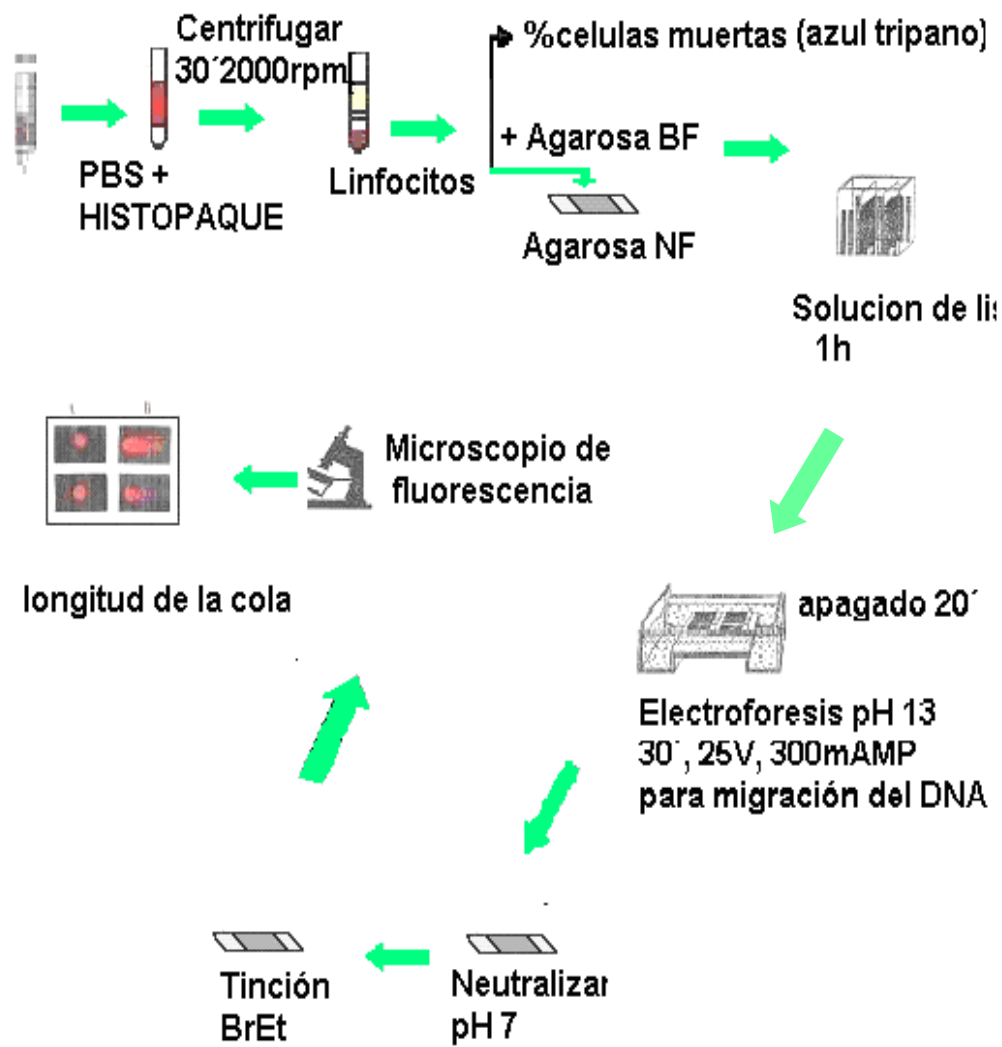
El daño en el ADN se detectó en linfocitos humanos. Estos se aislaron de sangre periférica de un hombre de 22 años de edad, sano, no fumador debido a que no

es un estudio de monitoreo genético se trabaja con una sola persona para evitar variabilidad y sesgos en los resultados. La separación de los linfocitos se hizo con 5 ml de sangre con gradiente de “*ficoll-histopaque*”, las células se resuspendieron en medio RPMI libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Con el fin de determinar efecto de dosis, los linfocitos se trataron con cinco dosis no tóxicas de cada extracto. Luego se incubaron a 37°C . La viabilidad celular se midió antes y después de una hora de tratamiento mediante un hemocitómetro colocado en un microscopio con objetivo de 40X y ocular de 10X. Las células muertas por su pérdida en la integridad de su membrana, ingieren colorantes como azul de tripan, eritrosina B ó nigrosina azul de tripan. Por lo tanto las células vivas se observaron transparentes y las muertas se vieron coloreadas. El marcador de viabilidad se define como el número de células muertas sobre el número total de células observadas (*Strober, 1991*).

El ensayo cometa se procesó según la metodología propuesta por *Singh et al.* (1988) y modificada por *Pandurangi et al.* (1995). Las células tratadas, mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5%, se pipetearon sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (NMA), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca, por mínimo una hora. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH >13) (NaOH 10N y EDTA 200mM) a 4°C por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las rupturas de los sitiosapurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V, 300mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio (figura 8). Las células se observaron de manera manual (*Rajaguru et al., 2002; LI Yi-qiang et al., 2006*) en un microscopio marca Nikon con un filtro verde de una longitud de onda de 540nm, con un aumento de 400X y un micrómetro ocular de 20X con un valor máximo de medición de $100\mu\text{m}$. Se hicieron tres experimentos independientes y se analizaron 100 células por cada tratamiento (50 células por placa) (*Rajaguru*

et al., 2002). El daño del ADN se midió con base en la longitud en μm de la migración de los fragmentos de ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola, hay más fraccionamiento del ADN) (Maluf and Erktmann, 2000; Zang et al., 2000; Hartmann et al., 2001; Zhong et al., 2001; Kamer y Rinkevich, 2002; Hartmann et al., 2003). Para medir el daño también se tiene en cuenta la frecuencia de células dañadas. Los linfocitos, cuyas colas sean mayores a dos veces la longitud promedio del control, se clasificaron como células dañadas.

Figura 8. Protocolo ilustrativo del ensayo cometa



7. RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Los resultados del Índice de Mutación (IM) obtenidos por el test de Ames, debido a que no se ajustan a la distribución normal (Shapiro Wilk : $p < 0.05$), se analizaron con la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis, para muestras independientes, U de Mann Witney para muestras independientes y análisis de correlación de Spearman. Para los datos de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo cometa solo se tomó el parámetro de (longitud de cola en μm) por que la lectura se hizo manual según (Rajaguru et al., 2002), se promediaron (medianas) con base en los datos de 50 células por cultivo de linfocitos (unidad experimental) y como cumplieron con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianza, se analizaron mediante (ANOVA) factorial (Zang et al., 2000; Zhong et al., 2001). El análisis se hizo con el programa estadístico SPSS, con un nivel de significancia máximo de 0,05. En todas las tablas, N se refiere al número de platos o cajas de petri.

Tanto para el test de Ames como para la prueba cometa, se desarrolló análisis de regresión lineal, para identificar asociación con las concentraciones de los extractos: 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 y 3 mg de extracto diluidos en un ml de DMSO al 50% para Ames y 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25 y 1.5 mg de extracto diluidos en un mililitro de DMSO al 50% para la prueba cometa.

Los promedios reales para los controles negativos; es decir tratados con (DMSO al 50%) son los que se observan en el cuadro 2:

Cuadro 2. Promedio de revertantes espontaneas de los controles negativos en las cepas TA98 y TA100, con y sin S9.

Tratamiento + DMSO al 50%	Promedio de revertantes por plato
TA98 con S9	17
TA98 sin S9	17.8
TA100 con S9	92
TA100 sin S9	84.5

Los análisis del IM de los diferentes extractos evaluados en este estudio se hicieron con base a su relación con el control negativo (DMSO al 50%). En consecuencia, el IM de los controles negativos siempre es 1, puesto que se divide sobre si mismo, por esta razón este dato no aparece en las diferentes tablas, ni gráficas.

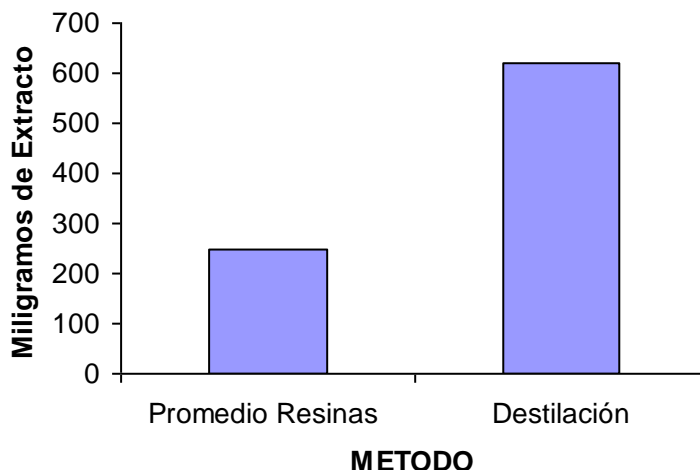
También se usó otro control negativo que fue el agua bi-destilada y desionizada estéril, que se somete al mismo proceso realizado con las muestras y como control positivo se usó 2 amino-fluoreno, que es un mutágeno indirecto que necesita activación metabólica (S9+). Los datos de estos controles no se usaron para los análisis estadísticos, por que su utilidad es para comprobar marcas, plasmidos y verificar con que cepa, se hace el ensayo.

7.2. COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO OBTENIDO POR RESINAS Y DESTILACIÓN DE PELÍCULA ASCENDENTE, EN LA QUEBRADA LAS PALMAS.

Este experimento se hizo con la finalidad de probar un nuevo mecanismo de extracción de material orgánico de cualquier muestra de agua, que se está desarrollando en el laboratorio del Grupo interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM de la Universidad de Antioquia. Aunque esta tecnología está en desarrollo es muy prometedora, para obtener la cantidad suficiente de extracto necesario para llevar a cabo los diferentes ensayos, ya que por resinas, la cantidad de extracto obtenido es menor (ver figura 9). La cantidad de extracto obtenido por destilación del agua de la quebrada Las Palmas en un muestreo fue

(610 mg) en cambio el obtenido en la misma quebrada, pasándolo por resinas fue (250 mg),

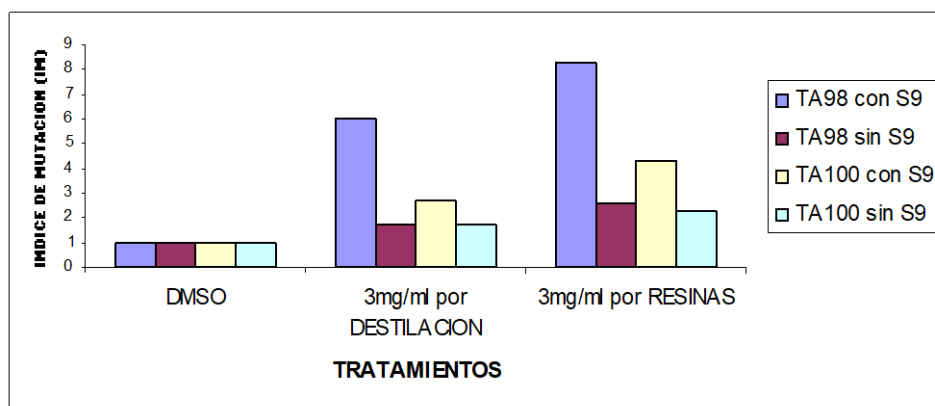
Figura 9. Cantidad de extracto en mg obtenido por los dos métodos de extracción



7.2.1 Comparación de mutagenicidad inducida por 3 mg/ml de extractos del agua de la quebrada Las Palmas, obtenidos por resinas y destilación de película ascendente, en las cepas TA98 y TA100 con y sin S9

En la figura 10 se observa una comparación entre dos métodos de extracción de mutágenos para determinar cual es mas eficiente en la retención de mutágenos. Se observa que el extracto obtenido por el método de resinas indujo un IM mayor que el de destilación, tanto en la cepa TA98 con y sin S9 como en la cepa TA100 con y sin S9.

Figura 10. Comparación del IM de las cepas TA-98 y TA-100 con y sin S9 tratadas con 3 mg/ml de extracto de Las Palmas, obtenidos por Resinas y por Destilación.



7.3 MUTAGÉNICIDAD EVALUADA POR EL TEST DE AMES CEPAS TA98 Y TA100, CON Y SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA

En la Tabla 1 se resumen los resultados promedio (Media y desviación estándar) de Mutagenicidad (IM) obtenidos en el test de Ames, para cada uno de los cuatro factores incluidos en el estudio (SITO, CEPA, ACTIVACIÓN METABÓLICA Y DOSIS DE EXTRACTO).

El factor Sitio (Palmas y planta “A”), influye significativamente en el IM con respecto al control ($p = 0.007$), con base en prueba no paramétrica; no obstante, el incremento promedio de la planta “A”, respecto de Palmas, es solo del 12%.

El factor Cepa (TA-98 y TA-100) y el Factor Activación Metabólica (Con S9 y Sin S9), influyen significativamente en el IM con respecto al control ($p = 0.000$), con base en prueba no paramétrica; el incremento promedio de la Cepa TA-98 respecto a la Cepa TA-100 es del 70% y el incremento promedio de la Activación Metabólica Con S9 respecto a Sin S9, es del 77%.

El factor dosis influyó significativamente en el IM con respecto al control ($p = 0.000$) con base en la prueba de correlación de Spearman y el IM incrementa

dependiendo directamente de la dosis mostrando mayor promedio de IM la mayor dosis (3mg/ml) y el menor promedio de IM lo tiene la menor dosis (0.5mg/ml)

Tabla 1. Índice de Mutación registrado en dos Sitios (Palmas y planta “A”), con dos Cepa (TA-98 y TA-100), y Con y Sin Activación Metabólica para siete Concentraciones de Extracto acuoso.

Índice de Mutación				
FACTORES		*X ± EE	N	Prueba; p = significancia estadística
SITIO	Palmas	2.029 ± 0.074	168	U = 11742.000 ^a p = 0.007
	Planta “A”	2.145 ± 0.074	168	
CEPA	TA-98	2.622 ± 0.074	168	U = 10682.500 ^a p = 0.000
	TA-100	1.552 ± 0.074	168	
ACTIVACIÓN METABÓLICA	CON S-9	2.671 ± 0.074	168	U = 9422.000 ^a p = 0.000
	SIN S-9	1.503 ± 0.074	168	
DOSIS DE EXTRACTO EN mg/ml	0.5	1.140 ± 0.037	56	Rho = 0.825 ^b p = 0.000
	1	1.296 ± 0.037	56	
	1.5	1.644 ± 0.037	56	
	2	2.476 ± 0.037	56	
	2.5	3.154 ± 0.037	56	
	3	3.896 ± 0.037	56	

^a Significancia estadística con la prueba U de Mann Whitney

^b Significancia estadística con la prueba de correlación de Spearman.

* Media +/- desviación estándar (Tamaño de Muestra)

Aunque los datos no cumplen con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianza, para identificar la interacción o dependencia entre los tres factores cualitativos (Cepa, Sitio y Activación metabólica), se realizó Análisis de Varianza Factorial con la cual se identificó interacción significativa estadísticamente (F = 8.657; p = 0.03) entre los factores.

En la Tabla 2, se resume el IM correspondiente a las ocho combinaciones resultantes de cruzar los tres factores cualitativos previamente analizados.

Mediante prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se identificó diferencia significativa estadísticamente entre las 8 combinaciones (Chi cuadrado = 56.357; p = 0.000). Al analizar las 8 combinaciones cualitativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (tabla 2), se logra concluir lo siguiente: las combinaciones de mayor mutagenicidad son: Palmas, cepa TA98, con S9 (casi 4 veces más que el control); planta “A”, cepa TA98, con S9 (3.2 veces más que el control); planta “A”, cepa TA100, con S9 (2 veces mas que el control) y las combinaciones de menor mutagenicidad son: planta “A”, cepa TA100, sin S9 (38% mas que el control) y Palmas, cepa TA100, sin S9 (18% mas que el control).

Tabla 2. Subconjuntos homogéneos de la combinación de Cepa, Sitio y activación metabólica (S9) mediante el test de Duncan

Cepa, Sitio y activación metabólica S9	N	IM	*X ± EE
TA100, Las Palmas, Sin S9	42	1.18 ^g	1.379 ± 0.306
TA100, planta “A”, Sin S9	42	1.38 ^f	1.379 ± 0.306
TA98, Las Palmas, Sin S9	42	1.54 ^e	1.542 ± 0.599
TA100, Las Palmas, Con S9	42	1.58 ^e	1.585 ± 0.656
TA98, planta “A”, Sin S9	42	1.91 ^d	1.911 ± 0.988
TA100, planta “A”, Con S9	42	2.06 ^c	2.064 ± 0.800
TA98, planta “A”, Con S9	42	3.22 ^b	3.225 ± 2.249
TA98, Las Palmas, Con S9	42	3.81 ^a	3.811 ± 2.796

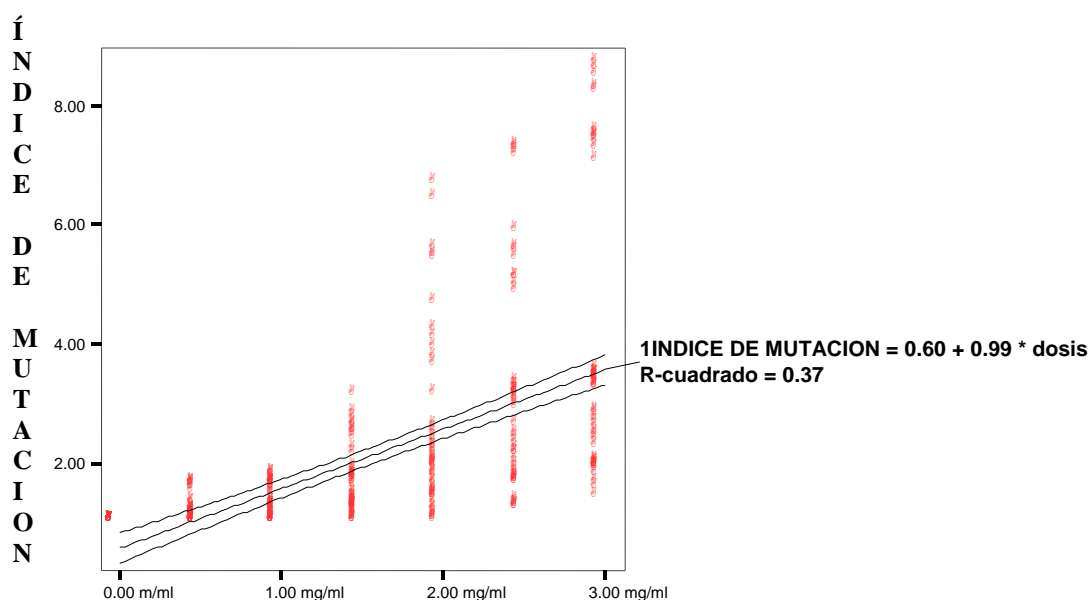
a,b,c,d,e,f,g: El valor promedio del IM se incrementa significativamente de G a A. Promedio con la misma letra no difieren entre sí. Basado en la prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan
 * Media +/- error estándar (Tamaño de Muestra)

7.3.1 Análisis de asociación entre las dosis del extracto y el IM.

Mediante la prueba no paramétrica de correlación de Spearman, se identificó asociación lineal positiva, significativa estadísticamente (p<0.05), entre las dosis del extracto y el IM (tabla 1). En la Figura 11 se observa el análisis de regresión con la ecuación respectiva, la cual indica que la dosis es directamente

proporcional al IM. El coeficiente de determinación ($R^2= 0.37$) permite inferir que la variabilidad observada en el índice de mutación depende en un 37% de la concentración de los extractos acuosos. El 63% restante, posiblemente depende de otros factores tales como el sitio de muestreo, de la cepa y de la activación metabólica.

Figura 11. Asociación lineal positiva entre dosis de extracto en mg/ml e índice mutagénico.



DOSIS DE EXTRACTO DE LAS ZONAS MUESTREADAS EN mg/ml

Para identificar como operan las dosis de los extractos acuosos, combinada con los tres factores cualitativos (Sito, Cepa y Activación Metabólica), respecto del IM, se cruzaron las siete dosis del extracto acuoso con las ocho combinaciones de la Tabla 2, resultando 56 combinaciones diferentes (ver anexo 1).

Mediante prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se encontró diferencia significativa (significancia asintótica = 0.000) entre los IM de las 56

combinaciones. En la Tabla 3 se resumen las 5 combinaciones de mayor Mutagenicidad y las 5 de menor Mutagenicidad.

Las combinaciones más mutagénicas se dieron en la cepa TA98, con S9 combinadas con la concentración más alta del extracto (3mg); en las cuales se registro un IM de 7 a 8 veces mayor que el registrado en el control negativo, tanto para planta “A” como para Las Palmas. Las combinaciones menos mutagénicas fueron Cepa TA-100 Sin S9 con las concentraciones 1.5 y 0.5 mg de extracto, tanto para Palmas como para la planta “A”.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos. Variable dependiente: ÍNDICE DE MUTACIÓN

Cepa, Sitio y activación metabólica (S9)	Dosis mg/ml	Media	Desv.típ.	N
Quebrada Las Palmas, Cepa TA98 Con S9	3.00	8.203	0.52	6
planta “A”, Cepa TA98 Con S9	3.00	7.335	0.175	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA98 Con S9	2.50	6.515	1.06	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA98 Con S9	2.00	5.678	0.7287	6
planta “A”, Cepa TA98 Con S9	2.50	5.308	0.36	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA100 Sin S9	0.5	1.023	0.063	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA100 Sin S9	1	1.05	0.030	6
planta “A”, Cepa TA98 Con S9	0.5	1.063	0.739	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA100 Sin S9	1.5	1.093	0.093	6
planta “A”, Cepa TA100 Sin S9	0.5	1.12	0.043	6

Este resultado confirma la importancia de la concentración del extracto como inductor de mutaciones y la mayor sensibilidad de la Cepa TA-98 con Activación Metabólica, para evaluar mutágenos respecto a la Cepa TA-100 y sin Activación Metabólica.

7.4 IDENTIFICACIÓN DE DAÑO EN EL ADN (EFECTO GENOTÓXICO), MEDIANTE EL ENSAYO COMETA.

En la tabla 4. Se resume el efecto genotóxico inducido en linfocitos humanos por el extracto de agua de dos sitios (Palmas y planta “A”), evaluado mediante el ensayo Cometa. El biomarcador de genotoxicidad es la “longitud de cola” (μm) del cometa que se forma cuando los fragmentos de ADN de las células dañadas se desplazan por electroforesis.

Mediante análisis de varianza factorial univariado, se detecta un débil incremento en la longitud de cola en los linfocitos tratados con el extracto del agua de “Las Palmas” ($57.44 \pm 15.08 \mu\text{m}$) respecto de la longitud de cola de los linfocitos tratados con agua de la planta “A” ($54.16 \pm 14.5 \mu\text{m}$); no obstante, la diferencia no alcanza a ser significativa al nivel del 5% ($p = 0.06$) (Ver tabla 4).

Tabla 4. Longitud de cola inducida por dosis, sitio de muestreo e interacción entre dosis y sitio de muestreo. También se observa la F y la p de ANOVA para cada caso.

Dosis (mg)	Longitud de cola *X (μm) \pm e. e.		Total de dosis	
	Palmas	Planta “A”		
DMSO	31.150 \pm 2.773	32.89 \pm 2.773	32.02 \pm 4.88	F= 53.81 p ^a = 0.00
0.5	48.92 \pm 2.773	46.527 \pm 2.773	47.72 \pm 2.3	
0.75	57.97 \pm 2.773	54.277 \pm 2.773	56.12 \pm 6.31	
1	59.527 \pm 2.773	58.527 \pm 2.773	59.02 \pm 6.53	
1.25	69.980 \pm 2.773	64.623 \pm 2.773	67.30 \pm 7.92	
1.5	75.797 \pm 2.773	68.127 \pm 2.773	71.96 \pm 10.36	
Total de sitio	57.244 \pm 15.08	54.1617 \pm 14.52	55.6931 \pm 14.78	
	F= 3.36; p ^b = 0.061		F= 0.711; p ^c = 0.618	

p^a= Significancia estadística al comparar las dosis.

p^b= Significancia estadística al comparar los sitios de muestreo.

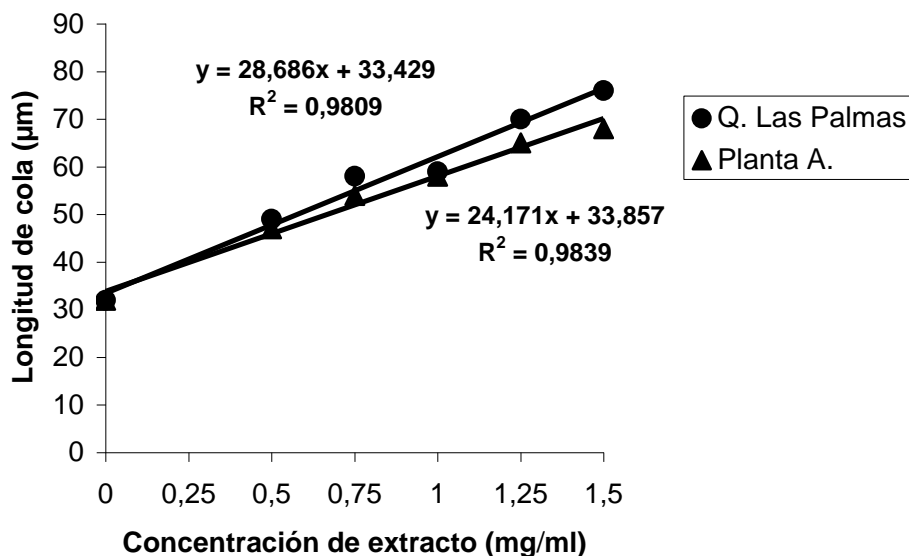
p^c= Significancia estadística de la interacción entre dosis y sitios de muestreo.

*Media \pm error estándar (Tamaño de muestra)

En consecuencia, se puede afirmar que el agua de los dos sitios se asemejan en su efecto genotóxico y, para detectar si la diferencia es realmente significativa, se debe repetir el estudio con un mayor tamaño de muestra; esto porque el nivel de significancia fue marginalmente significativa ($p = 0.06$).

Cuando se comparan las medias de longitud de cola de las diferentes dosis, incluido el control negativo, se determinó diferencia significativa de todas las dosis respecto al control ($F = 53.81$; $p = 0.00$). La diferencia en el efecto genotóxico de los extractos de agua, resultó ser independiente del sitio de origen, pues la interacción entre los dos factores (sitio y dosis) no fue significativa estadísticamente ($F = 0.711$; $p = 0.618$). Mediante análisis de correlación y regresión se identificó una asociación lineal positiva, significativa estadísticamente (Palmas: $r^2 = 0.98$, $p = 0.05$; planta "A": $r^2 = 0.98$, $p = 0.05$) entre las dosis de los extractos y la longitud de cola de las 300 células medidas por cada dosis (ver figura 12). El coeficiente de determinación (r^2) permite inferir que la variabilidad de la longitud de cola depende en un 98% de la concentración del extracto, en ambos sitios.

Figura 12. Asociación lineal positiva entre longitud de cola y dosis (mg/ml) de extracto de dos sitios de muestreo: Las Palmas y planta "A", promediado a partir de 300 datos por cada dosis.



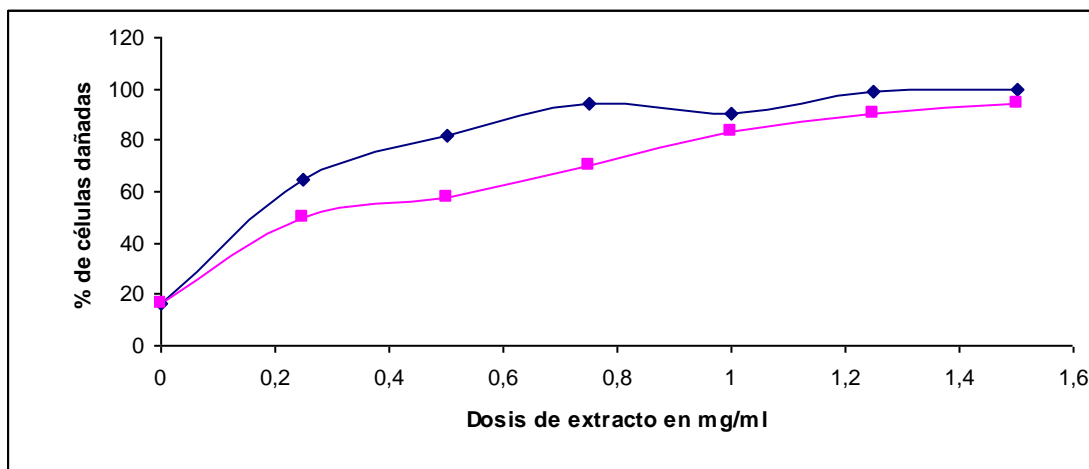
7.5 IDENTIFICACIÓN DE CITIOXICIDAD MEDIANTE LA VIABILIDAD CELULAR CON AZUL DE TRIPANO.

En la tabla 5, figuras 13 y 14, se presenta la viabilidad celular (%) y porcentaje de células dañadas (fracción de células con longitud de cola mayor al promedio del control), registradas en 300 células por dosis, en cada sitio.

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de daño inducido por los extractos de Las Palmas y de la planta “A” a las diferentes dosis evaluadas

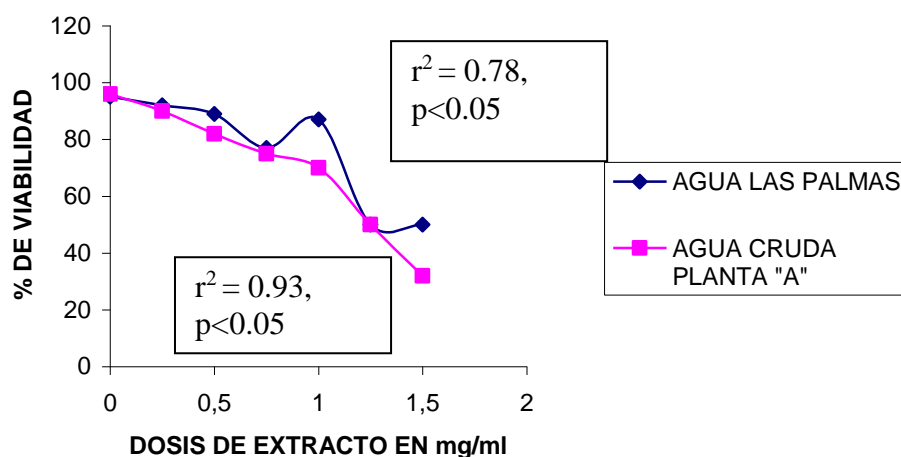
Sitio	Dosis (mg/ml)	% Viabilidad	% de daño
Palmas	DMSO	96	16
	0.5	82	65
	0.75	77	82
	1	70	94
	1.25	66	90
	1.5	50	99
Planta “A”	DMSO	95	16
	0.5	89	50
	0.75	75	58
	1	87	70
	1.25	50	83
	1.5	50	94

Figura 13. Porcentaje de linfocitos humanos dañados, expuestos una hora a las seis dosis de extracto en (mg/ml), tanto de la quebrada Las Palmas (□) como agua cruda al entrar a la planta “A” (□).



La viabilidad de los linfocitos humanos pre - tratamiento osciló entre 97 y 99%, y disminuyó en ambos sitios entre 30% y 50% en forma dosis dependiente, después de incubarlos por una hora con las diferentes concentraciones de los extractos de agua.

Figura 14. Viabilidad de linfocitos humanos después de una hora de tratamiento con las seis dosis de extracto tanto de Las Palmas (□) como de agua cruda al entrar a la planta “A” (□) medido mediante coloración con azul de tripano.



Mediante análisis de correlación y regresión se identifica una asociación lineal negativa, significativa estadísticamente (Palmas: $r^2:0.93$, $p<0.05$; planta "A": $r^2=0.78$, $p<0.05$), entre la concentración del extracto y el porcentaje de viabilidad celular (figura 15a y 15b). Con lo anterior se puede deducir que el porcentaje de viabilidad celular con el extracto de Las Palmas depende en un 93% de la dosis, mientras que con el extracto de la planta "A" depende en un 78% de la dosis.

Figura 15a. Asociación lineal negativa entre diferentes concentraciones del extracto del agua Las Palmas y porcentaje de viabilidad celular.

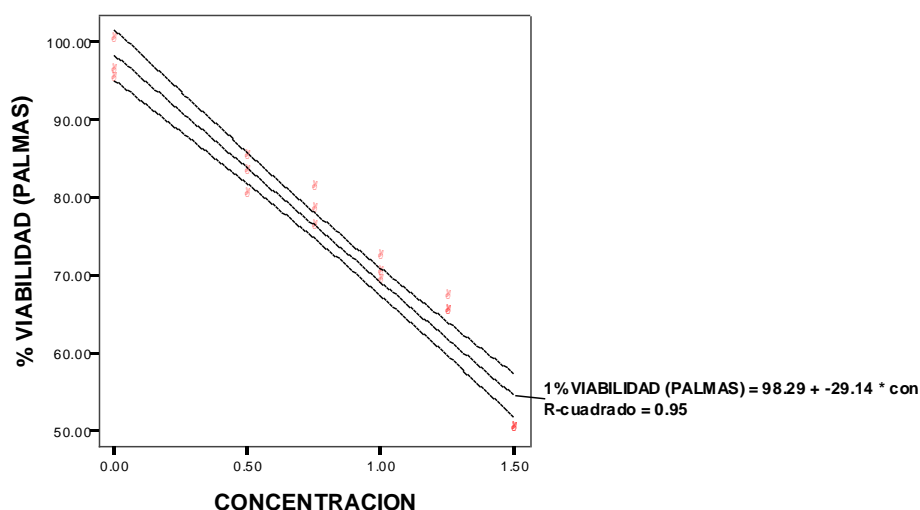
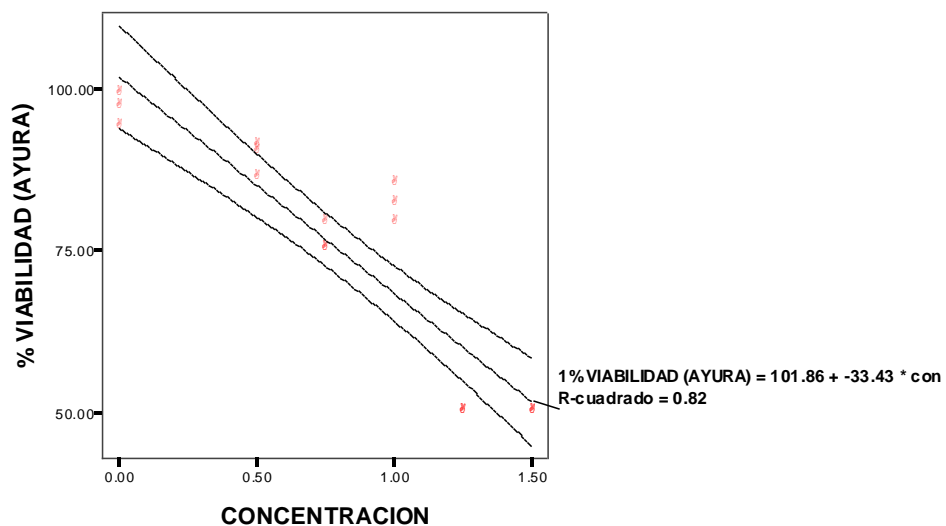


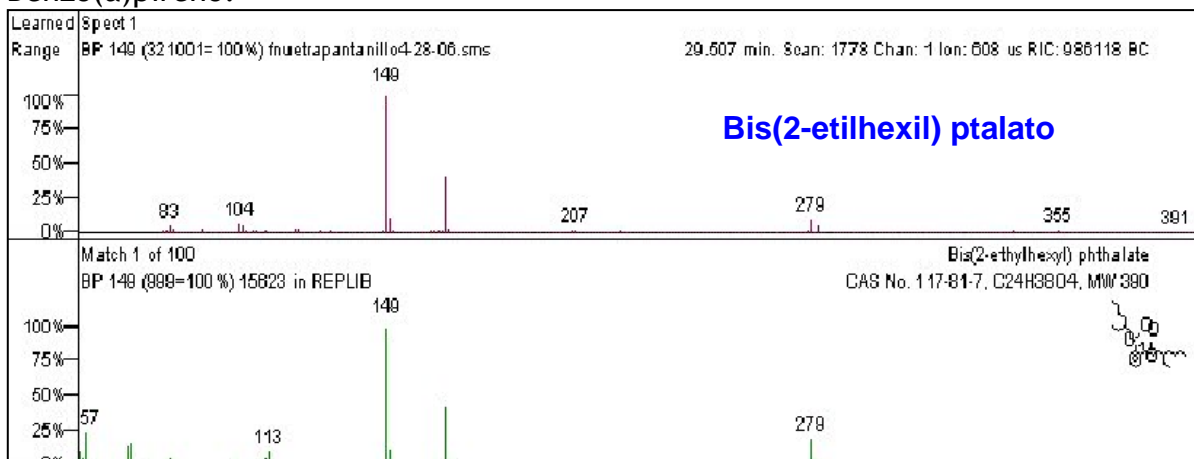
Figura 15b. Asociación lineal negativa entre diferentes concentraciones del extracto del agua de la planta "A" y porcentaje de viabilidad celular.

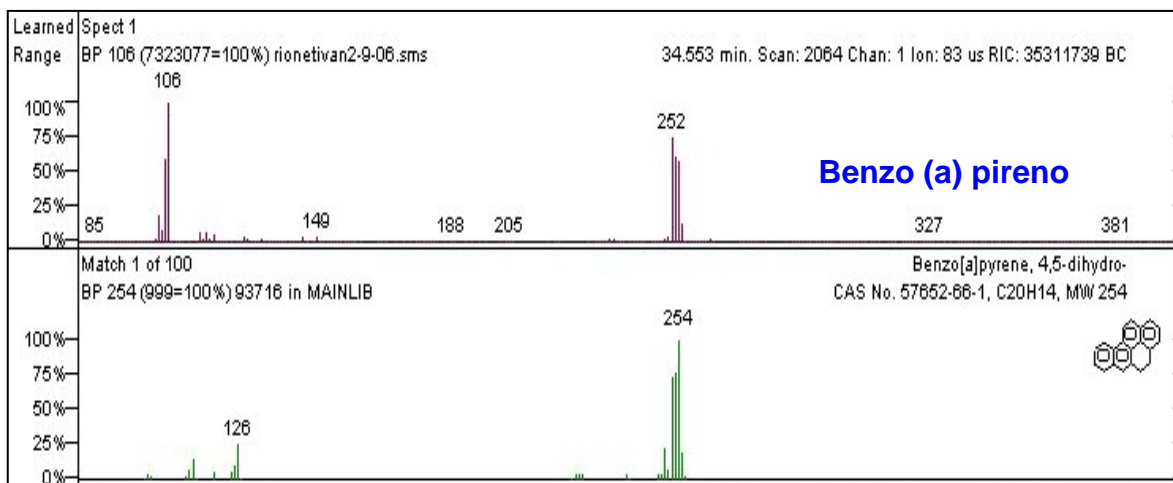
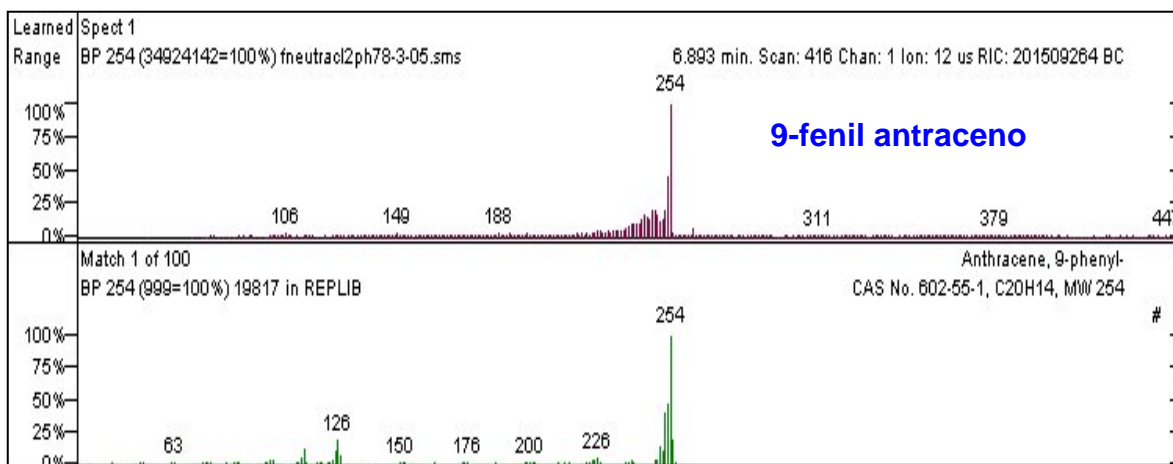


7.6 IDENTIFICACIÓN DE MUTÁGENOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS GC/MS

En el agua de la quebrada Las Palmas y en el agua cruda que entra a la planta “A” contaminados con residuos domiciliarios y de carpinterías, se encontraron los siguientes mutágenos: 2-etilhexil ptalato; 9-fenil-antraceno y benzo (a) pireno, los cuales son abundantes en dicha contaminación (IARC, 1983; et al., 1992; Onodera et al., 1991).

Figura 16. Mutágenos encontrados en las aguas de la quebrada Las Palmas y agua cruda de la planta “A”. a) Bis(2-etilhexil)ptalato., b) 9-fenil antraceno., c) Benzo(a)pireno.





8. DISCUSIÓN

El método de concentración por resinas del material orgánico del agua, es ampliamente soportado (Onodera et al., 1991; Guzzella and Sora, 1998; Guzzella et al., 2002; Zuleta et al., 2004; Kutlu et al., 2004; Sujbert et al., 2006). Sin embargo, la comparación de los dos métodos utilizados para extraer mutágenos y material orgánico del agua de la quebrada Las Palmas, arrojaron resultados importantes, ya que se observó que el método mas eficiente para obtener mayor cantidad de extracto fue el de destilación de película ascendente, debido a que concentra todo el material orgánico y material particulado suspendido en el agua, mientras que las resinas XAD son mas especificas y solo adsorben compuestos poco volatiles, lipofílicos con diferentes polaridades (*Ress y Au, 1979; Cremoresi et al., 1989*), como pesticidas (*Riley y Taylor, 1969; Kennedy, 1973*), aminoácidos (*Riley y Taylor, 1969*), ácidos alifáticos (*Gustafson et al., 1968; Riley y Taylor, 1969*), componentes miscelaneos individuales (*Riley y Taylor, 1969; Burnham et al., 1972*), alcaloides (*Fujimoto y Wang, 1970; Weissman et al., 1971*) y son muy eficientes en adsorber mutágenos en aguas (*Guzzella and Sora, 1998*) tales como ptalatos (*Onodera et al., 1991*) que son clasificados en la base de datos de RTEC (RETCS, 1992) como teratogénicos y carcinogénicos, nicotina, cafeína, benzofenonas (*Guzzella and Sora, 1998*) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (*Zuleta et al., 2004*). Según *Junk et al., 1974*, en la evaluación de 83 químicos disueltos en agua, las resinas XAD recuperaron el 91% del peso promedio de los químicos orgánicos, o sea el método de resinas es mas eficiente en el momento de retener mutágenos, mientras que el proceso de destilación es muy inespecifico y concentra todo lo que se encuentre disuelto en el agua, incluido mutágenos y no mutágenos, por eso se obtiene mayor cantidad de extracto, pero este extracto induce menor mutagenicidad que el obtenido por resinas; esto puede deberse a que los mutágenos están adheridos a macromoleculas como: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas, que son muy estables, por lo tanto necesitan procesos

químicos para desestabilizarlos y así se poderse unir al ADN (Zhang and Wang, 2000).

Los estudios nacionales e internacionales sobre mutágenos en cuerpos de agua contaminadas con residuos industriales, agroquímicos y aguas negras demuestran que hay un incremento en el IM y la longitud de cola (*Meléndez et al 2001; Ohe et al, 2003; Zuleta et al, 2004; Umbuzeiro et al 2004; Mathur et al 2005; Cardozo 2006*), concordando con este estudio, que identificó un incremento, respecto del control, en el número de revertantes en las cepas TA 98 y TA 100 de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica y en la longitud de cola de linfocitos humanos, expuestos a las diferentes dosis de aguas contaminadas de la quebrada Las Palmas y agua cruda que entra a la planta “A”.

El incremento de IM en presencia de S9, en las cepas evaluadas, indican que estas aguas reciben constantemente descargas de desechos de zonas urbanas, de expendio de carnes fritas y asadas, de zonas agrícolas e industriales (carpintería y bombas de gasolina) que contienen mutágenos, en su mayoría indirectos, que necesitan activación metabólica para inducir mutación por pérdida o ganancia de bases (TA 98) y sustitución de bases (TA100).

El agua del de la planta “A”, tuvo mayor efecto mutagénico que el agua de Las Palmas. No obstante, se podría afirmar que la composición de los dos extractos es distinta, de acuerdo a las ubicación geográfica de ambos sitios, ya que a Las Palmas le llegan constantemente contaminantes (algunos mutágenos), donde muchos de estos son transportados en el agua conservando sus características físicas y químicas (Vargas et al., 2001), hasta llegar a la represa la Fé previa a la planta “A” (fig. 4). Estos contaminantes juntos con otros aportados por otros afluentes, son acumulados y pueden llegar directamente en mayor proporción a la planta “A”.

La mayor frecuencia de mutagenicidad observada de los extractos acuosos de ambos sitios, fue de acción indirecta en presencia de activación metabólica. Esto indica que en estas aguas hay mayor concentración de mutágenos indirectos ó sea que necesitan ser metabolizados para activarse y así poder interactuar con el ADN. Entre estos compuestos, los mas comunes que se han encontrado en estudios similares son: aminas heterocíclicas (*Zuleta et al., 2004*), hidrocarburos policíclicos aromáticos (*Cardozzo et al., 2006*) y nitrosaminas (*Mitch et al., 2003*). Un posible mecanismo para que estos compuestos se activen es por dos procesos: El primer proceso es llevado a cabo por citocromo p450 (CYP1A2) y el segundo es llevado a cabo por o-acetyltransferasa y sulfotransferasa, ocasionando así especies altamente reactivas capaces de unirse al ADN (*McManus et al., 1990; Tureky et al., 1991; Boobis et al., 1996; Sugimura, 2000*).

En este trabajo la mutación más inducida por los extractos acuosos de ambos sitios fue por pérdida y ganancia de bases (Cepa TA98). Las aminas heterocíclicas son mutágenos indirectos (*Zhu et al., 2000*) que inducen mutación por pérdida o ganancia de bases, formadas en la costra quemada de alimentos proteicos fritos y asados (*Pfau et al., 2006*), pueden llegar a las aguas por medio de la orina y heces fecales de las personas que las consumen. Las aminas más abundantes encontradas en los cuerpos de agua que presentan este tipo de contaminación son las arilaminas, que son compuestos altamente mutagénicos y eventualmente carcinogénicos (*IARC, 1975*), se encuentran generalmente en desechos industriales; que en el caso de la planta “A” y Palmas, vienen en desechos de colorantes usados en la carpintería. Algunos colorantes, cuando son descargados dentro del río, pueden permanecer suspendidos en el agua (*Garrison y Hill, 1972; Maguire y Tracz, 1991*) ó pueden ser absorbidos por el botón de sedimentos o bioconcentrados (*Umbuzeiro et al., 2004*). Algunos estudios han relacionado la actividad mutagénica de los ríos con la presencia de aminas aromáticas (*Ono et al., 2000; Zuleta et al., 2004*).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), que provocan mutación por pérdida o ganancia de bases, son aportados también por la contaminación (*Granella et al 1995; Hakura et al 2003*), son formados por la combustión incompleta de material orgánico (*Yang et al., 2003*), y pueden llegar a estas aguas por desechos industriales, residuos domiciliarios, lluvias, escorrentías o procesos atmosféricos (*Urano 1998; Zuleta, et al 2004; Cardozo et al 2006*). El benzo- a- pireno, fue encontrado en estas aguas mediante GC/MS (fig. 16c) y es uno de los HPA más comunes a nivel ambiental, ya sea libre o en mezcla compleja (*White, 2002*) y por lo tanto uno de los más estudiados (*De Marini et al., 1994*). El mecanismo de acción del benzo- a -pireno en la cepa TA 98 ha sido determinado (*Bell et al., 1991; De Marini et al., 1993; Levine, 1994*) y consiste en una mutación inducida en un punto caliente consistente en la delección de bases (CG ó GC) en la secuencia CGCGCGCG. Otro HPA identificado en estas aguas mediante GC/MS es el antraceno (fig. 16b), el cual induce mutación en la cepa TA98 (*Fracasso et al., 1999*) y es muy común en las aguas de los ríos (*Yunker et al., 2002; Mitra and Bianchi, 2003; Doong y Ling, 2004*).

Los ptalatos, son compuestos mutagénicos que actúan por mutación de perdida o ganancia de bases (*Fracasso et al., 1999*) y pueden llegar a los ríos por desechos industriales (*Onodera et al., 1991*). En esta agua se determinó presencia de ptalatos (fig. 16a), aportando así mutagenicidad en la cepa TA98.

En aguas negras, a nivel mundial, se han encontrado varios tipos de benzotriazoles que son mutágenos indirectos de origen industrial que inducen revertantes más que todo en la TA98 (*Nukaya et al., 1997; Shiozawa et al., Shiozawa et al., 2000; Nukaya et al., 2001; Watanabe et al., 2002*).

La disminución del IM en la cepa TA100 con y sin activación metabólica, en comparación con la TA98, tanto en la quebrada Las Palmas como en la planta "A", puede ser atribuido a varios procesos de interacción entre metabolitos y blancos genéticos en la cepa TA100 (*HisG46, G-C*) (*Levin et al., 1982*). Estas aguas

evaluadas, son alimentadas principalmente con desechos domiciliarios y no han sido sometidas a procesos de cloración, por lo tanto no hay productos de cloración como trihalometanos y furanonas, que son fuertes mutágenos con gran afinidad en la cepa TA100 (*Sujbert et al., 2006*). Otra razón para el bajo IM en la TA100, puede ser que en las aguas estudiadas hayan muy bajas concentraciones de nitrosaminas que son mutágenos indirectos (*Lijinsky et al 1999; Yamasaki et al 1992*) que actúan por sustitución de bases (*Prival et al., 1983; Guttenplan, 1987; Cooper and Porter, 2000*) y sus proporciones incrementan después de la cloración (*Mitch and Sedlak, 2002*).

En esta investigación se identificó una relación dosis-efecto entre las concentraciones de los extractos acuosos de ambos sitios y los marcadores de mutagenicidad (IM) y daño genético (Longitud de cola). Según DeMarini (1991), la asociación lineal positiva entre las dosis y los biomarcadores de mutagenicidad y genotoxicidad puede deberse a la aditividad entre compuestos intrínsecos de cada extracto (mezclas complejas), que expresa las sumas de las respuestas mutagénicas con respecto al incremento proporcional de la dosis. Además, Taylor y colaboradores (1995), afirmaron que las interacciones entre dos mutágenos similares no tienden a reaccionar entre sí por sus características electrofílicas, sino que reaccionan con otras moléculas presentes en el extracto, macromoléculas celulares ó de la mezcla S9. Por lo tanto, contando solo con pruebas mutagénicas y genotóxicas, no es posible predecir el efecto aditivo, sinergismo o antagonismo de varios químicos en sistemas biológicos.

Los resultados del presente ensayo cometa, demuestran que los extractos acuosos de Las Palmas y de la planta "A", inducen diferentes niveles de daño del ADN en linfocitos humanos. Esto se debe posiblemente a que en esta agua están presentes mutágenos tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, amins heterocíclicas y nitrosaminas, que forman aductos con el ADN (*Koeda et al., 1978; Shamsudin et al., 1988; Ohe, 1997; Garry et al., 2003*), ocasionando así sitios

apurínicos, permitiendo su fragmentación e incremento de cola (Ashby et al., 1995; Vaghef et al., 1996; Speit et al., 1996; Sasaki et al., 1997).

Sin embargo, la variedad y composición de los extractos orgánicos de las aguas evaluadas son muy diferentes, debido a las condiciones de situación geográfica, cantidad de materia orgánica y gradiente topográfico; por lo tanto, los niveles de daño del ADN en linfocitos humanos en las mismas dosis de extracto es mayor en Las Palmas que en la planta “A”.

Con respecto a la genotoxicidad los dos sitios (Palmas y planta “A”), presentaron diferencia marginal estadísticamente, lo que indica que el extracto de la quebrada Las Palmas indujo una genotoxicidad ligeramente mayor que el de la planta “A”. Esto podría ser causado debido a que en la represa la Fé algunos contaminantes genotóxicos pesados, en forma libre o unidos al material orgánico (ácidos fúlvicos y húmicos), serán depositados, ya que la tasa de sedimentación en la represa aumenta, debido a las condiciones de bajo gradiente topográfico (Baisch, 1994; Guzzella and Sora, 1998; Kutlu et al., 2004) y muchos de estos compuestos pueden descender a condiciones afóticas, disminuyendo así su potencial genotóxico (Duque et al, en proceso de publicación). Además, según Ramírez et al., 2005, en esta represa se ha encontrado gran cantidad de material orgánico y diversidad de microorganismos, por lo tanto pueden interactuar entre sí complejamente y transformar compuestos genotóxicos en no genotóxicos (Rand and Petrocelli, 1985; Reifferscheid et al., 1991).

Los resultados mostraron efecto citotóxico mediante el marcador de viabilidad celular de los linfocitos humanos sometidos a extractos acuosos de Las Palmas y de la planta “A”. Con respecto a la viabilidad inducida por mezclas complejas no hay bibliografía citada, pero algunos mutágenos en estado libre, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, encontrados frecuentemente en las aguas, han mostrado ser citotóxicos. Mahandervan et al., (2005), lograron observar citotoxicidad causada por aductos de HPAs en el ADN, antes de la muerte celular.

Otros trabajos respaldan, que estos mutágenos y sus derivados, disminuyen la viabilidad celular en muchos tipos de célula (Geary *et al.*, 1996; Myllynen *et al.*, 2007).

Las anteriores razones discutidas pueden ser la causa por la cual compuestos mutagénicos pueden acumularse en la represa La Fé, dando como resultado que la mutagenicidad por pérdida/ganancia de bases o por sustitución de bases con y sin activación metabólica, sea estadísticamente diferente entre los dos sitios muestreados, induciendo mayor actividad mutagénica el agua de la planta “A”. Por otro lado, la genotoxicidad fue diferente marginal estadísticamente entre los dos sitios muestreados, siendo Las Palmas con mayor efecto genotóxico, indicando que muchos compuestos genotóxicos no alcanzan a llegar a la planta “A”.

Los test de Mutagenicidad y Genotoxicidad son cortos, económicos y muy sensibles y los resultados obtenidos, tienen una tendencia diferente entre los dos test, debido a que las células procariotas y eucariotas responden de manera diferente a los compuestos de las mezclas complejas. Por lo tanto, las dos pruebas se complementan ya que el test de Ames es una prueba de diagnóstico que corrobora presencia de mutágenos y se complementa con el ensayo cometa porque detecta daño en el ADN humano. Finalmente la asociación de las dos pruebas consiste en que los mutágenos son propensos a dañar el ADN humano, independientemente de que sean directos o indirectos.

9. CONCLUSIONES

- Se identificó asociación lineal positiva entre la mutagenicidad (IM) y genotoxicidad (longitud de cola) y la concentración de los extractos acuosos de la quebrada Las Palmas y del agua cruda que entra a la planta de potabilización “A”.
- En las dos cepas se identificó efecto mutagénico de los extractos acuosos respecto del control negativo; sin embargo, fue en la cepa TA-98 en donde este efecto fue mayor; es decir mutación por pérdida y ganancia de bases.
- Mediante activación metabólica se identificó mayor mutagenicidad tanto para las dos cepas como para las diferentes concentraciones del extracto acuoso, es decir mutagenicidad indirecta.
- En ambos sitios se detectan mutágenos directos (sin activación metabólica) que provocan mutación por sustitución de bases (Cepa TA100), pero menos abundantes que los mutágenos indirectos que provocan mutación por pérdida o ganancia de bases (Cepa TA98).
- En cuanto a la Genotoxicidad, el extracto acuoso de Las Palmas induce un mayor daño que el extracto acuoso de la planta “A”; no obstante, la diferencia es marginalmente significativa. Para detectar con mayor seguridad si los dos sitios son iguales o diferentes se debe aumentar el tamaño de la muestra para ambos.
- La viabilidad celular se asocia lineal y negativamente con la concentración de los extractos acuosos. El aumento de la dosis también provocó un incremento en el porcentaje de células dañadas que son el número de células con longitud de cola mayor a la del control, contadas en 300 células tratadas.
- Aunque la cantidad de extracto obtenido por destilación de película ascendente es mucho mayor que la cantidad obtenida por resinas, el

potencial mutagénico (IM) de 3 mg/ml de extracto por resinas es notoriamente mayor que los 3 mg/ml obtenidos por destilación de película ascendente, tanto en las dos cepas(TA98 y TA100), como en la presencia y ausencia de S9,

- En la quebrada Las Palmas y agua cruda que surte la planta de potabilización “A”, contaminados con residuos domiciliarios y de carpinterías, la mutagenicidad predominante fue indirecta por pérdida o ganancia de base. Esta característica coincide con el tipo de mutágenos encontrados en estos sitios 2-etilhexil phtalato; 9-fenil-antraceno y benzo (a) pireno, los cuales son abundantes en dicha contaminación.

10. IMPACTO ESPERADO A PARTIR DEL USO DE LOS RESULTADOS

Si las Empresas Publicas de Medellín (EE.PP.MM) aplican las medidas apropiadas para impedir que los reservorios que abastecen la planta de potabilización “A” se contamine con mutacarcinógenos, el impacto esperado es la obtención de agua potable libre de mutacarcinógenos y por lo tanto, sin riesgo de aumentar el cáncer y otras enfermedades en la población expuesta.

Este impacto se podrá lograr a largo plazo, dependiendo de la rapidez en la aplicación de las normas sugeridas.

También se busca en base a este proyecto y otros que se han desarrollado en el grupo de muta génesis ambiental, sentar las bases o justificación para incluir pruebas de análisis mutagénico en el control de calidad de aguas para el consumo humano

El indicador verificable es la ausencia de mutacarcinógenos en aguas de consumo. Se conocerá si los mutágenos presentes en la quebrada Las Palmas y el agua cruda que entra a la planta “A” tienen la capacidad de penetrar en linfocitos humanos e interactuar con su ADN.

11. RECOMENDACIONES

Con base en estos estudios se debe buscar la manera de que el Estado Colombiano haga cumplir e incluya en la legislación (Decreto 475 de 1998) que le exija a las empresas publicas tener en cuenta parámetros mutagénico y genotóxicos para la calidad de aguas potables

Para estudios futuros se recomienda realizar un fuerte estudio epidemiológico para conocer la incidencia del consumo de agua en la presencia de cáncer, teniendo en cuenta que en Antioquia el cáncer de estomago es el más frecuente, para poder empezar a hacer una relación directa entre consumo e incidencia y tomar medidas correctivas que lleven a la prevención para que contribuyan a disminuir las altas tasas de mortalidad por esta causa.

También es recomendable hacer un estudio *in vivo* con peces o micro fauna y flora, y un inventario de los mismos en la zona influenciada por este fenómeno de contaminación, para hacer un diagnostico mas profundo acerca del real estado de la calidad de estas aguas y su influencia en el ecosistema.

Este trabajo es un primer llamado de atención para que las plantas de potabilización tomen medidas para mejorar la calidad de las aguas potables que distribuye en esta ciudad, así como, se debe buscar y desarrollar nuevas tecnologías que permitan una mejor potabilización, teniendo en cuenta que se aplique una extracción eficiente de las partículas mutagénicas y genotóxicas.

Se debe buscar la aprobación de políticas que impidan el vertimiento de desechos doméstico, industriales y agropecuarios en ríos y quebradas que alimentan plantas de potabilización, o por lo menos exigir un buen

tratamiento de esta agua de desecho antes de llegar a los ríos y quebradas, y se deben invertir recursos para la recuperación ambiental de estas riveras.

En consecuencia de lo anterior, futuras plantas de potabilización se alimentarán de ríos y quebradas que presenten una muy baja antropización e industrialización a lo largo de su rivera hasta la llegada a la planta de tratamiento.

Con base a la experiencia en cuanto a la calidad de aguas en una ciudad como Medellín, se recomienda que este tipo de estudio debe emprenderse en Popayán de inmediato para poder dar un diagnóstico y empezar con medidas correctivas que permitan evitar que a las aguas potables de Popayán lleguen agentes mutagénicos, aun hay tiempo de evitar una problemática tan grave como la presenta Medellín y otras ciudades del país.

Una recomendación especial es que se continúe ensayando con la obtención de extractos a partir de destilación de película ascendente para buscar la manera de validar esta técnica e incentivar la investigación e innovación en el país

BIBLIOGRAFIA

(SMEWW) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 1985. American public Health Assoc., American water Work Association and Water pollution Control Federation. 16 th edn., M.A.H. Franzon, Washington, DC, pp.856-858.

Akanuma-Watanabe, M., Shimoi, K., Kinae, N., Ohta, T., 1997. Food-derived heterocyclic amines potentiate the mutagenicity of a drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). *Mut. Res.* 337, 225-229.

Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides F, Partanen T, Carrato A. 2002. Occupational exposure to organic solvents and k- ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 23: 101- 106.

Ames, B.N. and McCann, 1981. Validation of Salmonella test: A reply to Rinkus and Legator. *Cancer. Res.* 41, 4192-4196.

Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A).* 70, 782-786.

Andreyev H, Norman A, Cunningham D, Oates J and Clarke P. 1998. Kirsten ras mutation in patients with colorectal cancer: the multicenter RASCAL study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 675-684.

Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A., Browne, M.A., 1995. *Mutagenesis.* 10, 85.

Badawi, A.E., Cavalieria, E.L., Rogan, E., 2002. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and hydroxylation of 17 β -estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis.* 21, 8-15.

Baisch, P., 1994. Les oligo-elements metalliques du systeme fluvio lagunaire Dos Patos (Brésil). Flux et Devenir, Doctoral thesis, L' Universite de Bordeaux I. Bordeaux.

Barba, L.E., Gutierrez, H.M., 2004. Factibilidad de degradación anaerobia del pesticida carbofuran. *A Codal,* v47, n° 205, 46-47.

Barnes, W., Tuley, E., Eisentstadt, E., (1982). Base-sequence analysis of His⁺

revertants of the *hisG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.* 4, 297 (abstr. Aa-1).

Bartsch, H., Malaveille, C., Camus, A.M., Planche-Martel, G., Brun, G., Hautefeuille, A., Sabadie, N., Barbin, A., Kuroki, T., Drevon, C., Piccoli, C., Montesano, R., (1980). Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutat. Res.* 76, 1-50.

Bautista D, Obrador A, Moreno V, Cabeza E, Canet R, Benito E, Bosc X. And Costa J. 1997. K-ras mutation modifies the protective effect of dietary monounsaturated fats and calcium on sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiology. Biomarkers Prev.* 6: 57-61.

Bell D, Thompson C, Taylor J, Miller C, Perera F, Hsieh L and Lucier G. 1992. Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase α .. *Environ. Health Perspect.* 98:113-117.

Bell, D.A., Levine, J.G., and DeMarini, D.M., 1991. DNA sequence analysis of revertants of the *hisD3052* allele of *Salmonella typhimurium* TA98 using the polymerase chain reaction and direct sequencing: application to 1-nitro-pyrene-induced revertants. *Mutat. Res.* 252, 35-44.

Bishop J. 1999. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64:235 - 248.

Blair, A., Zahm, Y., 1995. Agricultural exposures and cancer. *Environ. Health. Perspect.* 103, 205-208.

Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mut Res.* 543: 251 -272.

Boobis, A.R., Gooderham, N.J., Edwards, R.J., Murray, S., Lynch, A.M., Yadollahi-Farsani, M., Davies, D.S, 1996. Enzymes and interindividual differences in the metabolism of heterocyclic amines. *Arch. Toxicol.* 18, 286-302.

Bos J, Fearon E, Hamilton S, Verlan De Vries M, Van Boom J, Vander E. and Vogelstein B. 1989. Prevalence of ras gene mutation in human colorectal cancer. *Nature* 327:293-297.

Bradlow H. L., *Sternids*, 11(1968) 265

Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S. and Speit, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *En: Mutagenesis.* Vol. 20, (2005); P. 245-254

Brown, L.M., Blair, A., Gibson, R., Everet, K.P., Cantor, L.M., Shuman, L.F., Buemestein, S.F., VanLier, F.D., 1990. Pesticide exposures and other agricultural risk factors of leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer. Res.* 50, 6585-6591.

Bull R.J., Birnbaum L.S., Cantor K P., Rose B.J. Butterworth B.E., Pegram R. and Tuomisto J. (1995). Symposium Overview. Water chlorination: essential process or cancer hazard. *Fundamental and Applied Toxicology* 28, 155-166.

Burnham A. K., Calder G., Fritz J., Junk G., Svec H. And Willis R, *Anat. Chem*, 44 (1972) 139

Buschini, A., Carboni, P., Furlini, M., Poli, P., Rossi, C., 2004. Sodium hypochlorite-, chlorine dioxide-, and paracetamol acid-induced genotoxicity detected by the comet assay and *Saccharomyces cerevisiae* D7 test. *Mutagenesis*. 19, 157-162.

Cabello G., Valenzuela M., Vilaxa A., Duran V., Rudolph I., Hrepic N., and Calaf C. 2001. A rat mammary tumor model induced by organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholine esterase inhibition. *Environ. Health Perspectives* 109(5):471-479.

Cantor, K.P., Blair, A., Everett, G., Gibson, R., Burmesiter, L.F., Brown, L.M., Schuman, L., Dick, F.R., 1992. Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer. Res.* 52, 2447-2955.

Cardozo. T. R., Rosa. D. P., Feiden. I. R., Rocha. J. A., Avila de Oliveira. N. C., Pereira. T. S., Pastoriza. T. F., Marques. D. M., Lemos. C. T., Terra. N. R., Vargas. V. M. F. 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research*. 603: 83-96.

Carrero E, Bugliosi E, Meucci L, Baiocchi C, Gilli. 2000. Biological drinking water treatment processes, with special referent to mutagenicity. *Water Research*, 34: 3042-3054.

Cerná, M., Pastorková, A., Smíd., J., Bavorová, H., Ocadlíková, D., Rösner, P., Zavadil, J., 1996. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. *Toxicol. Letters*. 88, 191-197.

Clonfero E, Montini R, Venier P. and Levis A. 1989. Release of mutagens from finished leather. *Mut Res*. 226: 229-233.

Coleman M, Esteve J, Damiacki P, Arslan A. and Renard H. 1993. Trends in cancer incidence and mortality. IARC Scientific Publications No. 121, IARC, Lyon, 1- 806.

Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. En: *Mol. Biotechnol.* Vol. 26, (2004); P. 249-261.

Cooper, M.T and Porter, T.D., 2000. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase - deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome p450 2E1 and reductase. *Mutat. Res.* 452, 45-52.

Cremonesi, A., Rindone, B., Galassi, S., Guzzella, L., 1989. Extraction and analysis of organic micropollutants in river water. In proceedings of 10th International Symposium on Capillary Chromatography, eds. P. Sandra and G. Redant, pp. 558-571. Riva del Garda, Italy.

Culp S.J.m, Taylor D.X .m, Sheldon W.G., Goldstein L.S and Beland F.A (1998). A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo (a) pyrene in a 2 years bioassay. *Carcinogenesis*, 19: 117 - 124

Daignault, S.A., Noot, D. K., Williams, D. T., Huck, P.M., 1988. A review of the use of XAD resins to concentrate organic compounds in water. *Water Research.* 22, 803-813.

Decreto 475 de 1998 (Marzo 10) Por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable en Colombia.

De Flora S, Balansky R, Gasparini L, and Camoirano A. 1995. Bacterial mutagenicity of cigarette smoke and its interaction with ethanol. *Mutagenesis.*10: 47 - 52.

De la Cruz Rodríguez ER, Huaman Gutiérrez JO. 2002. Formación de hidrocarburos policíclicos aromáticos y del 3, 4 benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento. Tesis. Universidad Mayor de San Marcos. Lima - Perú.

DeMarini, D.M. (1991). Environmental mutagens/complex mixtures, in A.P. Li and R.H. Heflich (Eds.), *Genetic Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 285-302.

DeMarini, D.M., Bell, D.A., Levine, M.L., Shelton, M.L and Alu-Shakra. A., 1993. Molecular analysis of mutation induced at the hisD3052 allele of *Salmonella* by single chemicals and complex mixtures. *Environ. Health. Perspect.* 101 (suppl.3), 207-212.

DeMarini, D.M., Shelton, M.L and Bell, D.A., 1994. Mutation spectra in *Salmonella* of complex mixtures: comparison of urban air to benzo [a] pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.* 24, 262-275.

DeMarini, D.M., Abu Shakra, A., Felton, C.F., Patterson, K.S., Shelton, M.L. 1995. Mutation spectra in *Salmonella* of chlorinated, chlorominated or ozonated drinking water extracts: comparison to MX. *Environ. Mol. Mutagenesis.* 26, 270-285.

Delfino R, Rashmi Sinha, Cynthia Smith, John West, Edward White, Henry J. Lin, Shu-Yuan Liao, Jason S.Y. Gim, Hoang L. Ma, John Butler, and Hoda Anton-Culver. 2000.

Breast cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and *N*-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis*. 21: 607-615.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE, defunciones 1999 (base de datos Bogotá DC).

DeVivo I, MaRíon M, Smith S, Carney P. and Brandt-Rauf W. 1994. Mutant *c-K-ras* p21 protein in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl chloride. *Cancer Causes Control*, 5, 273-278.

Diaz R, Lopez-Barcons, Ahn D, Garcia A, Yoon A, Matthews J, Manges R, Perez R, and Pellicer A. 2004. Complex effects of Ras proto-oncogenes in tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 25: 535 - 539.

Dipper A. And Bigger C. 1991. Mechanism of action of food - associated polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Mut Res*. 259: 263-76.

Doak, S.M.S., R.W. Hend, A., Van der Wiel and P.F. Hunt. 1985. Carcinogenic potential of hydro treated petroleum aromatic extracts, *Br. J. Ind. Med.* 42, 380-388.

Dolara, P., Ricci, V., Burrini, D., Griffini, Q., 1981. Effect of ozonation and chlorination on the mutagenic potential of drinking water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 1-6.

Doolite, D., Rahn, C., Burger, G., Lee, C., Reed, B., Riccio, E., Howard, G., Passanati, G., Vesell, E., Hayes, A., 1989. Effect of cooking methods of the mutagenicity of food and on urinary mutagenicity of human consumers. *Food. Chem. Toxicol.* 27, 657-666.

Duque Henao Adriana, Margarita Zuleta, Carlos Peláez, Paula Salazar y John Fredy Quintero. 2005. Efecto mutagénico de los afluentes que abastecen una planta de potabilización de aguas e influencia del tratamiento sobre dicho efecto. Aceptado para publicar en *Actualidades Biológicas*.

Environmental Protection Agency. "Water Quality Criteria Data Book, Vol. 1-Organic Chemical Pollution of Freshwater," Water Quality Office, Project No. 18010DPV (December 1970).

Environmental Working Group (EWG) 1999. Tap water in central valley tainted with banned pesticide. <http://www.ewg.org/pub/home/reports/dbcp/dbcp.html>.

European Community, 1999. Proposal for a directive of the European parliament and of the council amending for the nineteenth time council directive 76/769/eec relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azo colorants), com/99/06/20 final-cod 99/02/0269. *Official Journal c 089 e*, 28/03/2000 p.p. 67-69.

Fallon R.D and Fliermans C.B (1980). Formation of nonvolatil mutagens by water chlorination persistence and relationship to molecular weight on organic material in water. *Chemosfera* 9, 385 - 391

Fairbairn, D.W., Olive, P. L. and O`neill, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *En: J. Urol.* Vol. 339, (1995); P. 37-59

Felser D, Zeterberg A, Zhu J, Tlsty T. and Bishop M. 2000. Overexpression of myc cause p53-dependent G2 arrest of normal fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:10295-10672.

Felton, J.S and Knize, M.G., 1990. heterocyclic amines mutagen/carcinogen in foods. *En: Cooper GS, Grover PL (eds). Chemical carcinogenesis and mutagenesis I. Handbook of experimental pharmacology.* Berlin, Springer-Verlag. 94, 471-502.

Felton J, Jagerstad M, Knize K, Skog K, Wakabayashi in: (2000) M. Nagao, T. Sugimura (Eds.), *Food Borne Carcinogens Heterocyclic Amines*, Wiley, Chichester, England, p. 31.

Felton J., Knize M., Malfatti, Salmon C. 2002 Human Exposure to Heterocyclic Amine Food Mutagens/Carcinogens: Relevance to Breast Cancer. *Env. Mol. Mutagen.* 39 N°2/3: 112-119.

Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E., 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic test. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 61: 239-245.

Ferguson L. 2002. Natural and human-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Toxicology* 181-182; 79-82.

Fielding, M., Horth, H., 1986. Formation of mutagens and chemicals during water treatment chlorination. *Water supply.* 4, 103-126.

Finke B., *Anal. Chem.*, 44, No. 9 (1972) 18A.

Fracasso, M. E., Franchetti, P., Mossini, E., Tieghi, S., Perbellini, L., Romeo, L., 1999. Exposure to mutagenic airborne particulate in a rubber manufacturing plant. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 441, 43-51.

Frandsen, H., 1997. Excretion of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline Phlp-dG, Phlp-DNA and DiMeIQX-DNA from rat. *Carcinogenesis.* 18, 1555-1560.

Fujimoto J. and Wang R., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16 (1970) 186

Gabbani, G., Nardini, B., Bordin, A., Pavanello, S., Janni, L., Celotti, L., Clonfero, E., 1990. Urinary mutagenicity on TA98 and YG1024 *Salmonella typhimurium* strains in a hamburger meal: influence of GSTM1 and NAT2 genotypes. *Mutagenesis*. 13, 187-191.

Gabbani G, Nardini B, Bordin A, Pavanello S, Janni L, Celotti L, Clonfero E. 1998. Urinary mutagenicity on TA98 and YG1024 *Salmonella typhimurium* strains after a hamburger meal: influence of GSTM1 and NAT2 genotypes. *Mutagenesis*. 13(2):187-91.

García Villanova R.J., Garcia C., Gómez A., García M.P. and Ardanuy R. (1997). Formation, evolution and modeling of trihalomethanes in the drinking water of a town: IY at the municipal treatment utilities. *Wat Res*. Vol. 31 N° 6:1299-1308.

García, M.I., Canoira, L., Blasquez, G., Da Riva., Alcántara, R., Llamas, J.F, 2005. Continuous photodegradation of naphthalene in water catalyzed by TiO₂ supported on glass rasching rings. *Chem. Enging. Journal*. 110: 123-128.

Garner, R.C., Miller, E.C., Miller, J.A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer. Res*. 32 (1972), 2058-2066.

Garrison, A., Hill, D. 1972. Organic pollutants from mill persist in downstream waters. *Amer. Dysest. Rep*. 61, 21-25.

Garry, S., Nesslany, F., Aliovat, E., Haguenoer, J.M., Marzin, D., 2003. *Mutat. Res*. 534, 33-43.

Gauthier, L., Levi, Y., Jaylet, A. 1989. Evolution of clastogenicity of water treated with sodium hypochlorite or monochloramine using a micronucleus test in neut larvae (*pleurodeles wahl*). *Mutagenesis*, 4:170-173.

Geary, L.F., Bleczínsky, W., Harvey, R.G., Penning, T.M, 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*. 99, 55-72.

Giver R, Wong R, Moore I, and Pallavicini M. 2001. Dermal Benzene and Trichloroethylene induce Aneuploidy in immature hematopoietic in vivo . *Env . Mol. Mutagen* . 37 : 185-194 .

Godoy W, Albano R, Moreas E, Alvares P, Nunes R, Saito E, Higa C, Filho I, Cruel C, Lang M. and Ribeiro L. 2002. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in

humanoesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis* 23: 611-616.

Godschalk R, Nair F, van Schooten A, Risch P, Drings K, Kayser H, Dienemann, and Bartsch H. 2002. Comparison of multiple DNA adduct types in tumour adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis* 23: 2081 - 2086.

Gooderham, N.J., Creton, S., Zhu, L.H. 2007. Mechanism of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP. *Toxicology letters*, 168: 269-277.

Goto, S., Endo, O., Matsumoto, Y., Sakai, S., Akutagawa, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Watanabe, T., Sera, N., Tsukatami, H., Tada, A., Wakabayashi, K., 2000. Mutagenicity of airborne particle, river water and soil in Japan. *Environ. Mutagen. Res.* 22, 45-54.

Granella, M., Bullarin, C., Nardini, B., Marchioro, M., Clonfero, E., 1995. Mutagenicity and contents of polycyclic aromatic hydrocarbons in new high viscosity naphthenic oils and used and recycled mineral oils. *Mutat. Res.* 343, 145-150.

Grubbs, C., Hill, L.D., McDonough, K.C., Peckham, H., 1983. N-nitroso-N-methylurea induced mammary carcinogenesis: Effect of pregnancy on preneoplastic cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 71, 625-627.

Gustafson R., Albright R., Heister J., Lirio J., and Reid O., *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, 7 (1968) 107

Guttenplan, J.B., Milstein, S., 1982. Resistance of *Salmonella thyphimurium* TA1535 to O⁶- guanine methylation and mutagenesis induced by low doses of N-Methyl- N- nitro- N- nitrosoguanidina: an apparent constitutive repair activity. *Carcinogenesis*. 3, 107-122.

Guttenplan, J. B., 1987. N - nitrosamines: bacterial mutagenesis and in vitro metabolism. *Mutat. Res.* 186, 81-134.

Guzzella, l and Sora, S., 1998. Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in northern Italy. *Wat. Res.* Vol 32, N° 6, 1733-1742.

Guzzella, L., Feretti, D., Monarca, S., 2002. Advanced oxidation and adsorption technologies for organic micropollutant removal from lake water used as drinking water supply. *Wat. Res.* 36, 4307-4318.

Guzzella, L., Monarca, S., Zani, C., Feretti, D., Zerbini, I., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., Richardson, S. D., 2004. In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. *Mutat. Res.* 564, 179-193.

Guzzella, L., Caterino, F. D., Monarca, S., Zani, C., Feretti, D., Zerbini, I., Nardo, G., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., 2006. Detections of mutagens in water distribution systems after disinfection. *Mutat. Res.* 608, 72-81.

Hakura, A., Susuki, S., Sawada, S., Sugihara, T., Hori, Y., Uchidas, K., Keins W.D., Sagami, F., Motooka, S., Satoh, T. 2003. Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.37: 20-27.

Hall A, Campbell S, O'Neill M, Roysto D, Nylander K, Carey F and Kernohan N. 2000. Expression of the p53 homologue p63 α and Np63 α in normal and neoplastic cells. *Carcinogenesis* 21:153-160.

Hamed S, Larue H, Hovington H, Girard J, Jeannotte L, Latulippe E, and Y Fradet I. 2004. Accelerated Induction of Bladder Cancer in *Patched* Heterozygous Mutant Mice. *Cancer Res.* 64: 1938-1942.

Harris C, Hollstein M. 1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl. J. Med.* 329:1318.

Hartman A, Blaszyk H, Kovach J and Sommer S. 1997. Epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet.*, 13, 27.

Hartmann, A., Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R., 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source the umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 377-382.

Hartmann, A., Golet, E.M., Gartisier, S., Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R.M., 1999. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 115-119.

Hartmann, A., A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H.J. Martus, A. Fjällman, W. Frieauff, W. Suter, Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 103-118.

Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F., Suter, W., 2003. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.* 536, 27-38. *mutat. Res.* 536, 27-38.

Hartwell H, Kastan L. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-1828.

Hartwig, A., 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals*. 8, 3-11.

Hayashi S, Wantanbe J, Nakachi K, and Kawajiri K. 1991. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J. Biochem.* 110: 407-411.

Henderson R. F. 1996. Special differences in the metabolism of benzene. *Env Health Perspect* (104 /Supp 6): 1399 - 1404.

Holmbom B.R., Voss R.H., Mertimer R.D and Won A (1981). Isolation and identifications in an Ames mutagenic compound present in Kraft chlorination effluents. *Tappi*, 64, 172 - 174.

Horsfall, M.J., Gordon, H.J., Burns, P.A., Zielenska, M., Van der Vliet, G.M., Glickman, B.W., 1990. Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 107-122.

Hung R, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, and Porru S. 2004. Genetic polymorphisms of *MPO*, *COMT*, *MnSOD*, *NQO1*, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 25: 973 - 978.

Hussain S, and Harris C. 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 58:4023-4037.

IARC, 1975. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some aromatic azo compounds. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 357 p.p.

International Agency for Research on Cancer (IARC) Polynuclear Aromatic Compounds, part I, Chemical, Environmental, and Experimental Data, World Health Organization. Lyon, 1983

IARC (International Agency for Research on Cancer), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Solar and ultraviolet radiation* Vol. 55, IARC Press, Lyon (1992).

IARC (International Agency for Research on Cancer), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans 1997a. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8* Vol. 70, IARC Press, Lyon (1997).

IARC (International Agency for Research on Cancer), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Polychlorinated Dibenzo-para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans* Vol. 69, IARC Press, Lyon (1997b).

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2003. Some anti-thyroid and related substance nitrofurans and industrial chemicals. Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Man. Lyon, France, vol. 71, pp. 487-501.

Inami, K., Mochisuki, M. 2002. Chemical models for cytochrome p450 as a biomimetic metabolic activation system in mutation assays. *Mut. Res.* 519: 133-140.

International Agency for Research on Cancer (IARC), Globocan 2001. Cancer incidence mortality and prevalence. World wide (computer program) version 1.0. Lyon France.

Irwin M, Marin M, Phillips A, Seelan S, Smith D, Liu W, Flores E, Tsai K, Jacks T, Vousden H. and Kaelin W. 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1 induced apoptosis. *Nature* 407:645-648.

Izzotti A, Balansky R, Blagoeva P, Mircheva Z, Tulimiero L, Cartiglia C, and De Flora S. 1998. DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J*, 12(9): 753 - 758.

Jäger I, Hafner C. and Schneider S. 2004. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cell. *Mut. Res.* 561 (1/2): 35-44.

Jägerstad, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., Sugimura, T., 1984. Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. *Mutat. Res.* 126, 239-244.

Jolibois, B., Guerbet, M., Vassal, S. 2003. Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere.* 51, 539-543.

Junk G. et al. "Use of Macroreticular Resins in the Analysis of Water for Organic Contaminants," *J. Chromatog.* 99, 745 (1974).

Junk G. et al. "Contamination of Water by Synthetic Polymer Tubes," *Environ. Sci. Technol.* 8, 1100 (1974)

Junk G. and Svec H., "The use of Macroreticular Resin in the Analysis of Water for Trace Organic Contaminants," 21st Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Paper No. P1, San Francisco (May 1973).

Junk G. et al. 1976. "Resin Sorbtion Methods for Monitoring Selected Contaminants in Water," Techniques and Methods of Analysis. Chaoter 9, 136-153

Kakizoe T. 1997. *Cancer Statistics in Japan*. FPCR publication, Tokyo, Japan, 10-18.

Kamer I, Rinkevich B, 2002. *In vitro* application of the coiiict assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line[J]. *Toxicol in Vitro*, 16: 177-184.

Kampman E, Voskuil D, Kraats A, Balder H, Muijen G, Goldbohm R. and Veer P. 2000. Animal products and K-ras codn 12 and 13 mutation in colon. *Carcinogenesis*. 21:307-309.

Kataoka, H., Hayatsu, T., Hietsch, G., Steinkellner, H., Nishioka, S., Narimatsu, S., Knasmüller, S., Hayatsu, H., 2000. Identification of mutagenic amines (IQ, Trp-P-1 and A α C) in the water in the Danube River. *Mutat. Res.* 466, 27-35.

Kato S, Shields P, Caporaso N, Hoover R, Trump F, Sugimura H, Weston A, and Harris C. 1992. Cytochrome P450 IIE1 genetic polymorphisms, racial variation and lung cancer. *Cancer Res* 52: 6712-6715.

Kavanough M.C., Trussell A.R., Cromer J and Trusser R.R (1980). An empirical kinetic model of THM formation: application to meet the proposed THM standars. *J. Am. Wat. Works Assoc.* 72, 578 - 582

Kennedy D., *Environ. Sci. Technol.*, 7 (1973) 138

Kelvey-Martin, V. J., Green, M. H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P. and Collins, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *En: J. Urol.* 288, (1993); P 47-63

Kleinsasser H, Norbert E, Kastenbauer R, Weissacher H, Muenzenriedes K, 2000. Phthalates Demostrare Genotoxicity on Human mucosa of the Upper Aerodigestive Tract. *Env Mol Mutagen* 53: 9 - 12.

Knize, M.G., Felton, J.S. 2005. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr. Rev.* 63, 158-165.

Komulainen, H. 2004. Experimental cancer studies of chlorinated by products. *Toxicology*; 198 (1-3): 239.

Kool, H. J., van Kreyl, C. F., Persad, S., 1989. Mutagenic activity in groundwater in relation to mobilization of organic mutagens in soil. *Science. Total. Environm.* 84, 185-199.

Koreda, M., Moor, P.D., Wislog, P.G., 1978. Binding of a benzo a pyrene 7, 8 diol, 10- epoxyde to DNA, RNA and protein of mouse skin occurs with high stereo selectivity. *Science.* 199, 778-781.

Kronberg, L., Franzen, R., 1993. Determination of chlorinated furanones, hydroxyfuranones and butenedibleaching liquor. *Env. Sci. Technol.* 27, 1811-1818.

Kulp, Kristen S., Susan L. Fortson., Mark G. Knize and James S. Felton. 2003. An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food and Chemical Toxicology, Volume 41, Issue 12, Pages 1701-1710.*

Kun K. and Kunin R., *J. Polymer Sci.*, 6 (1965) 2689.

Kusamran, W.R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M., Sugimura, T., 1994. Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutat. Res.* 325, 99-104.

Kutlu, M., Aydogan, G., Susuz, F., Özata, A., 2004. The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk river in Turkey. *Environ. Toxicol and Pharm.* 17, 111-116.

LaRue M, Allard P. Simoneau M, Normand C. Pfister C., Moore L. Meyer F, Têtu B., and Fradet y. 2000. P53 point mutations in initial superficial bladder cancer occur only in tumours from current or recent cigarette smokers. *Carcinogenesis* 21: 101 - 106.

Latini, G., A. Del Vecchio, M. Massaro, A. Verrotti and C. De Felice, Phthalate exposure and male infertility, *Toxicology* 226 (2006), pp. 90-98.

Lauber, S., Ali, S., Gooderham, N.J. 2004. The cooked food derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine is a potent oestrogen: a mechanistic basis for its tissue-specific carcinogenicity. *Carcinogenesis*: 25, 2509-2517.

Lawther P.D., Commins B.T and Waller R.E (1965). A study of the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in gas works refort houses. *Brit J ind. Med.* 22, 13

Lear C, Klinge M, and Belinsky S. 2001. *p16INK4a* and *β-catenin* alterations in rat liver tumors induced by NNK. *Carcinogenesis* 22: 461 - 466.

LeCurieux, F., Nesslany, F., Munter, T., Kronberg, L., Marzin, D., 1999. Genotoxic activity of chlorohydroxifuranones in the microscale micronucleus test on mouse lymphoma cells and the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes. *Mutagenesis*. 14, 457-462.

Levin, D.E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1982. A new Salmonella strain (TA97), for the detection of frame shift mutations: a run of cytosines as a mutational hot spot. *Mutat. Res.* 94, 315-330.

Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N., 1982. A new Salmonella strain (TA102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 7445-7449.

Levine A. 1991. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 352: 453- 456.

Levine A. 1993. The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 623 -651.

Levine, J.G., Schaaper, R.M and DeMarini, D.M., 1994. Complex frame-shift mutations mediated by plasmid pKM101: mutational mechanism deduced from 4-aminobiphenyl induced mutation spectra in Salmonella. *Genetics*. 136, 731-746.

Li, Y.Q., Wu, Y.L., Chen, Y.G., Kong, Z.M. 2006. Genotoxicity evaluation and a primary risk assessment of organic pollutants in the drinking waters sources of Nanjing, China. *Journal of Environmental Sciences*. 18(5), 983-988.

Lijinsky, W., 1999. N- nitroso compounds in the diet. *Mutat. Res.* 443, 129-138.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Loyant V, Jaffre A, Breton J, Baldi I, Vital A, Chapon F, Dutoit S, Lecluse Y, Loiseau H, Lebailly P, Gauduchon P. 2005. Creening of TP53 mutations by DHPLC and sequencing in brain tumours from patients with an occupational exposure to pesticides or organic solvents. *Mutagenesis*. (5):365-73.

Lubet R, Huebne Kr, Fong L, Altieri D, Steele v, Kopelovich L, Kavanaugh C, Juliana M, Soong S, and Grubbs C. 2005. 4-Hydroxybutyl(butyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancers in mice: characterization of FHIT and survivin expression and chemopreventive effects of indomethacin. *Carcinogenesis*, 26: 571 - 578.

MacGregor J, Casciano D, Müller L. 2000. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Res.* 455: 3 - 20.

Maguire, J.R., Tkacz, R.J, 1991. Occurrence of dyes in the Yamasaka river, Quebec. *Water Pollut. Res. J. Can.* 26, 145-161.

Mahadevan, B., Luch, A., Bravo, C.F., Atkin, J., Stepan, L.B., Pereira, C., Kerkvliet, N.I., Baird, W.M, 2005. Dibenzo[*a,l*]pyrene induced DNA adduct formation in lung tissue in vivo. *Cancer Letters.* 227, 25-32.

Malfatti M, Ubick L, and Felton J. 2005. The Impact of glucuronidation on the bioactivation and DNA adduction of the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine *in vivo Carcinogenesis*, Advance Access published on June 8, 2005; doi: 10.1093/carcin/bgi151

Maluf S W, Erktmann B, 2000. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay[J]. *Mutat Res*, 471 : 17-21

Maron Dorothy M and Ames Bruce N (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*113: 173-215.

Marston C, Pereira C, Ferguson J. Fisher K, Hedstrom O, Dashwood WM, Baird. 2001. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) on the tumor initiation, PHA - DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PHA in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 22: 1077-1086.

Maruoka S ., Yamanaka S. and Yamamoto Y. (1985). Mutagenic activity in organic concentrate from Nihitakase River water in Kyoto City and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography. *Water Res.* 19, 249-256

Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Bijarnia, M.K. 2005. Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye of Sanganer, Jaipur (India): a case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 61: 105-113.

McCann, J., and B.N. Ames, 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella / microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.)*. 73, 950-954.

McCann, J., and B.N. Ames, (1977). The salmonella/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity, in: H.H. Hiatt, J.D. Watson and J.A. Winsten (Eds). *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1431-1450.

McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., (1975a). Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.). 72, 5135-5139.

McCann, J., Springarn, N.E., Kobori, J., Ames, B.N., 1975b. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester with R factor plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.). 72, 979-983.

McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Hugget, A., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H, 1990. Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochrome p-450. Cancer. Res. 50, 3367-3376

Meier, J.R., Balzac, W.F., Riccio, E.S., Stewart, B.E., Bishop, D.F., Condie, L.W., 1987. Genotoxic properties of municipal of waste water in Ohio. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16, 671-680.

Meléndez I, Zuleta M, Marín I, Calle J y Salazar D. (2001). Efecto mutagénico de aguas de consumo Tratadas en la Planta Villa Hermosa. IATREIA Vol. 14 N° 3:167-175.

Metcalf, L., 1981. Tratamiento y depuración de las aguas residuales. Barcelona: Editorial Labor, 2ª edición.

Meyer, U.A., 1994. Polymorphism of human acetyltransferase. Environ. Health. Perspective. 102, 213-216.

Minamoto T, Mai M and Ronai Z. 1999. Environmental factors as regulators and effectors of multistep Carcinogenesis. Carcinogenesis 20: 519-527.

Mirvish, S., 1975. Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics and *in vivo* occurrence. Toxicol. Appl. Pharmacol. 31, 325-351.

Mitacek E, Brunnemann K, Hoffmann D, Limsila L, Suttajit M, Martin N, and Caplan L. 1999. Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand. Carcinogenesis, 20: 133 - 137.

Mitch, W.A., Sedlak, D.L., 2002. Water. Sci. Techn. Water Supply. 2(3): 191-8.

Mitch, W.A., Gerecke, A.C., Sedlak, D.L, 2003. A N-Nitrosodimethylamine (NDMA) precursor analysis for chlorination of water and wastewater. Wat. Res. 37, 3733-3741.

Monarca S., Zani, C., Richardson, S., Thurston A., Moretti, M., Feretti, D., Vallarini, M. 2004. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected of drinking water. *Wat. Res*; 38: 3809-3819.

Monarca, S., Feretti, D., Collivignarelli, C., Guzzella, L., Zerbini, I., Bertanza, G., Pedrazzani, R. 2000. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban waste water. *Wat. Res.* Vol 34. No 17 p.p 4261-4269.

Monarca, S., Zanardini, A., Feretti, D., Dalmiglio, A., Falistocco, E., Maniaca, P., Nardi, G., 1998. Mutagenicity of lake drinking waters treated with different disinfectants in bacterial and plant test. *Water Research.* 32, 2689-2692.

Morelli M. 2000. Industry viewpoint on thresholds genotoxic carcinogenic. *Toxicol Pathol* 28(3): 396-404.

Morris R.D. 1995. Drinking water and cancer. *Env Health Perspect* 103 (suppl 8) : 225-231.

Moruoka, S., Yamanaka, Y., Yamamoto, Y., 1985. Mutagenic activity in organic concentrate from Nishitakase river water in Kyoto City and its fractionation in thin layer chromatography. *Wat. Res.* 19, 249-256.

Murkovic, M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, Volume 802, Pages 3-10

Myllynen, P., Kurttila, T., Vaskivuo, L., Vähäkangas, K, 2007. DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MFC-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxic. Letters.* 169, 3-12.

Nagao M, Sugimura, T. (Eds.) 2000. *Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines.* John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, pp. 31-72.

Nakajima T, Elovaara E, Anttila S, Hirvonen A, Camus A, Hayes J, Ketterer B, and Vainio H. 1995. Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis*, 16, 707-711.

NCI (1978a). Bioassay of 2,4-diaminoanisoole sulfate for possible carcinogenicity, NCI Carcinogenesis Technical Report Series No 84, DHEW publication No. (NIH) 78-1334.

NCI (1978b). Bioassay of tris(2,3-dibromopropyl)phosphate for possible carcinogenicity, NCI Carcinogenesis Technical Report Series No 76, DHEW publication No. (NIH) 78-1326.

NCI (1979a). Bioassay of 2,4-diaminotolueno for possible carcinogenicity, NCI Carcinogenesis Technical Report Series No. 162, DHEW publication No. (NIH) 79-1718.

NCI (1979b). Bioassay of 2-nitro-o-phenylenediamina for possible carcinogenicity, NCI Carcinogenesis Technical Report Series No 169, DHEW publication No. (NIH) 79-1725.

Nobokawa, T., Sanukida, S. 2001. Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water. *Wat. Res.* Vol 35, No 18. pp 4293-4298.

Noordsij, A., Van Beveren, J., Brant, A., 1983. Isolation of organic compounds from water for chemical analysis and toxicological testing. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 13, 205-217.

Norma técnica Colombiana, 2004. NTC 5167(Primera actualización) ICONTEC. Pág. 34.

Nukaya, H., Yamashita, J., Tsuji, K., Terao, Y., Ohe, T., Sawanishi, H., Katsuhara, T., Kiyokawa, K., Tezuca, M., Oguri, A., Sugimura, T., Wakabayashi, K. 1997. Isolation and chemical structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1061-1066.

Nukaya, H., Shiozawa, T., Tada, A., Terao, Y., Ohe, T., Watanabe, T., Asanowa, M., Sawahishi, H., Katsuhara, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 2001. Identification of 2-[2-(acetylamino)-4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBT-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutat. Res.* 492, 73-80.

Nyberg K, Michelson J, Putnam J, and Weinert T. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36: 617-656.

Ohe T. (1997). Quantification of mutagenic / carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trip- P1, Trip - P2 and PhIP contributing highly to genotoxicity of river water.

Ohe. T., White, P., DeMarini, D, 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutat. Res.* 534, 101-112.

Ohgake, H., Matsukara, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., Morita, K., Tokiwa, H., Hirota, T., 1982. Carcinogenicity in rats of the mutagenic compounds 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene. *Cancer lett.* 15, 1-7.

Olaya-Contreras P, Rodriguez-Villamil J, Posso-Valencia HJ, Cortez JE. 1998. Organochlorine exposure and breast cancer risk in Colombian women. *Cad Saude Publica* 14(suppl 3):125-132.

Olive, P., Banath, J. and Durand, R. Heterogenetyc in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *En: Radiat. Res. Vol. 122, (1990); P. 86-94.*

Ono, Y., Somiya, Y., Kawaguchi, T., 1996. Genototoxicity of substances on or ozonated drinking water extracts: comparison to MX. *Wat. Res.* 30, 569-577.

Ono, Y., Somiya, I., 1999. Identification of carcinogenic Trp-P-2 and Trp-P-1 in the effluent from a sewage treatment plant. *J. Environ. Syst. Eng.* 615, 69-74.

Ono, Y., Somiya, I., Oda, Y., 2000. Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water. *Water Research.* 34, 890-894.

Onodera, S. 1991. Characterization and determination of organic compounds in the mutagenic XAD-2 extracts of drinking water. *Journal of Chromatography A.* Volume 557, Pages 413-427.

Orozco L, López C, Naranjo L, and Zuleta M. 2003. DNA damage and identification of mutagenic heterocyclic amines in municipal wastewater which contaminate water purification plants. *Environ Mol Mutagen* 41:196.

Oyama T, Kawamoto T, Mizoue T, Sugio K, Kodama Y, Mitsudomi T. and Yasumoto K. 1997. Cytochrome P450 2E1 polymorphism as a risk factor for lung cancer: in relation to p53 gene mutation. *Anticancer Res.* 17: 583-588.

Pardo C., Murillo R., Piñeros M y Castro M. 2003. Casos nuevos de cáncer en el instituto nacional de cancerología. Colombia 2002. *Revista Colombiana de cancerología* 7 (3): 4 - 19.

Pandrangi R. Petras M. Ralph S. Vrozoc M. 1995. *Environ. Mol. Mutag.* 26, 345

Paustenbach DJ, Bass Rd, Price P. 1993. Benzene toxicity and risk assessments, 1972-1992: Implications for future regulation. *Environ Health perspect* 101 (6): 177-200.

Pfau, W., Rosenvold, K., Young, J.F. 2006. Formation of mutagenic heterocyclic aromatic amines in fried pork from Duroc and Laandrace pigs upon feed

supplementation with creatine monohydrate. *Food and chemical toxicology*. 44: 2086-2091.

Phillip M, Nesnow S, Davis C. 1999. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. *Mutation Res.* 426 : 143 - 145.

Philip L, Grover and Martin F. 2002. The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis* 23: 1095-1102.

Picer M, Kovac T, Britvic S, Picer N. 2001. The chemical and biogenotoxic xenobiotic in aquatic sediment materials. 1. The application and comparison of chemically non-specific and biogenotoxic methods. *Chemosphere* 44: 1673 - 1683.

Pitts, J.N., Cauwenbergne, D., Grosjean, J.P., Schmid, D.R., Fitz, W.L., Belser, J., Knudson, G.B., Hynds, P.M. 1978. Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science* 202: 515-519.

Pohjola, S., Lappi, M., Honkanen, M., Rantanen, L., Savela, K., 2003. DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis*. 18, 429-439.

Poirier M, and Beland F. 1992. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 749 - 55.

Poirier, M.C. and F.A. Beland (1994). DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in rodents. *Environ. Health. Perspect.* 102 (Suppl. 2) 161 -65.

Pollack N, Cunningham A, Rosenkrantz H. 2003. Persistence of chemicals and their carcinogenic risks to human. *Mutation Res.* 58: 81-91

Porter W, Jalger J, Carlson I. 1999. Endocrine, immune and behavioral effects of aldicarb (carbamate), atrazine (Triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at ground water concentrations. *Toxicol. Ind. Health*, 15(1-2):133-150.

Prival, M.J., 1983. The Salmonella mutagenicity assay: promises and problems. *Ann. NY. Academy. Sci.* 407, 154-163.

Prives C. and Hall P. 1999. The p53 pathway. *J. Pathol.* 187:112-126.

Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre and F.R. Westwood (1976) Evaluation of six short term test for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. *Nature (London)*, 264, 624-627.

Rajaguru P. Vidya L. Baskarasethupathi B. Kumar P. Palanivel M. Kalaiselvi K. 2002 Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutat. Res.* 517, 29-37.

Ramirez, J., Gutiérrez, F., Vargas, A., 2005. Respuesta de la comunidad fitoplanctónica a experimentos de eutrofización artificial realizados en la represa la Fé, el Retiro, Antioquia, Colombia. *Caldasia*. 27, 103-115.

Rand, G. M and Petrocelli, S. R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications*. Hemispheric Publishing Corporation, Washington. USA.

Randerath K, Randerath E, Zhou G, Supunpong N, He L, Mc Donald T, and Donnelly K. 1999. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lakes sediments as assessed by three different methods. *Env Mol Mutag* 33: 303-312.

Rees, G. A. and Au, L., 1979. Use of XAD-2 macroreticular resin for the recovery of ambient trace levels of pesticides and industrial organic pollutants from water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 561-566.

Reh B, DeBord G, Butle M, Reid M, Mueller C, and Fajen J. 2000. O⁶-methylguanine DNA adducts associated with occupational nitrosamine exposure. *Carcinogenesis* 21: 29-33.

Rehana Z, Malik A and Ahmad M. 1995. Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to pesticide pollution in the river between Kachia to Kannauj (U.P), India. *Mutation Res.* 343: 137-144.

Rehana Z, Malik A and Ahmad M. 1996. Genotoxicity of the Ganges water at Naroa (U.P), India. *Mutation Res.* 367: 187-193.

Reifferscheid, G., Heil, J., Zahn, R.K., 1991. Die erfassung von genotoxinen in wasserproben mit dem *umu*-mikrotest (Detection of genotoxins in water samples using the *umu*- microtest). *Vom Wasser.* 76, 153-166.

Richardson, S.D., 1998. Drinking water disinfection by-products, in: R.S. Meyers (Ed.), *Encyclopaedia of Environmental Analysis and Remediation*, Jhon Wiley and Sons, New York. 1398-1421.

Riley P. and Taylor D., *Anal. Chim. Acta*, 46 (1969) 307.

Rinkus, S.J., and M.S. Legator, 1979. Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer. Res.* 39, 3289-3318.

Rinkus, S.J., and M.S. Legator, 1981. Salmonella revisited: A reply to Ames and McCann. *Cancer. Res.* 41, 4196-4203.

Robert V, Michel P, Flaman J, Chiron A, Martin C, Charbonnier F, Paillot B, and Frebourg T. 2000. High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulation of genes involved in cell cycle and apoptosis. *Carcinogenesis* 21: 563 - 565.

Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., 1999. Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B.* 722, 225-254.

RTECS (1992). Database on Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. Cincinnati, U.S.A.

Rundle A, Tang D, Hibshoosh , Estabroo, Schnabel F, Cao W, Grumet S, and Perera F. 2000. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis* 21: 1281-1289.

Rundle A, Tang D, Hibshoosh H, Schnabel F, Kelly A, Levine R, Zhou J, Link B, and Perera F. 2002. Molecular Epidemiologic Studies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts and Breast Cancer. *Env Mol Mutagen* 39 (2/3): 201 - 208.

Sachse C, Smith G, Wilkie M, Barrett J, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop T, and Wolf C. 2002. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 23: 1839 - 1850.

Saillenfait, A.M., J.P. Sabate and F. Gallissot, Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, mono-n-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: in vivo and in vitro observations, *Reprod. Toxicol.* 17 (2003), pp. 575-583.

Saillenfait, A.M., J.P. Sabate and F. Gallissot, Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate, the methyl-branched analogue of di-n-butyl phthalate, administered by gavage to rats, *Toxicol. Lett.* 165 (2006), pp. 39-46.

Sasaki, Y.F., Saga, A., Akasawa, M., Yoshida, K., Nishidate, E., Su, Y.Q., Matsusaka, N., Tsuda, S., 1997. *mutat. Res.* 395, 189.

Scalan R. 1983. Formation and occurrence of Nitrosamines in food. *Cancer Research* 43: 2435-40.

Schut H, Cummings D, Lin E, Daniel F. 1997. ³²P-postlabelling analysis of DNA adduct formation of the drinking water mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl) - 5-hydroxy-2 (5H)-Furanone (MX). *Environ. Mol. Mutagen.* 17: 65-72.

Setlow R. 2001. Human cancer: etiologic agents/dose responses/DNA repair/cellular and animal models. *Mut Res* 477: 1-6

Shamsudin, A.K.M and Ghan, R., 1988. Immunocytochemical localization of benzo a pyrene DNA adducts in human tissues. *Hum. Pathol.* 19, 309-315.

Shanabruch, W.G., and G.C. Walker, 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA⁺lexA⁺*-dependent mutagenesis. *Mol. Gen. Genetic.* 179, 289-297.

Shea, K.M., American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health: pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers, *Pediatrics* 111 (2003), pp. 1467-1474.

Shen, J.H., Gutendorf, B., Vahl, M.M., Shen, L., Westendorf, J., 2003. Toxicological profile in surface water from an area in Taihu Lake and Angtze, Delta. *Toxicology.* 166, 71-78.

Shi J, Guang- Yang Y, Wang L, Xue, Feng B, Ding W, Xing E, and Yang S. 1999. Role of *p53* gene mutations in human esophageal carcinogenesis: results from immunohistochemical and mutation analyses of carcinomas and nearby non-cancerous lesions. *Carcinogenesis* 20: 591-597.

Shimada, T., Hayes, C.L., Yamasaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R., 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome p450 1B1. *Carcinogenesis.* 56, 2979-2984.

Shiozawa, T., Tada, A., Nukaya, H., Watanabe, T., Takahashi, T., Asanoma, M., Ohe, T., Sawanishi, H., Katsuhara, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 2000. Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole- type mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 535-540.

Siddiqui, A. H. and Ahmad, M., 2003. The Salmonella mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. *Mutat. Res.* 541, 21-29.

Sierra Torres CH, Salazar NC, Hoyos LS, Zuleta M, Whorton EB and Au WW. 1998. In vitro and in vivo genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. *Mutation Res.* 415:59-67.

Singh N.P, McCoy M, Tice R, Edgard E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191

Singh, N.P., Stephens, R.E., 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanism and DNA electrostretching. *Mutat. Res.* 383, 167-175.

Skog, K. 1993. Cooking procedures and food mutagens: A literature review *Food and Chemical Toxicology, Volume 31, Pages 655-675.*

Skog, K., Johanson, M., Jägerstad, M. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in cooked foods and model system- a review on formation and occurrence. *Food. Chem. Toxicol.* 36, 665-675.

Skog, K., A. Solyakov and M. Jägerstad. 2000. Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to aminocarbols in a meat juice model system. *Food Chemistry, Volume 68, Issue 3, Pages, 299-308.*

Sloof, W., De Zwart, D., Van de Kerkhof, J. F. J., 1983. Monitoring the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands for toxicity. *Aquat. Toxicol.* 4, 189-198.

Snyderwine E, Roller P, Adamson R, Sato S, and Thorgeirsson S. 2003. Reaction of N-hydroxylamine and N-acetoxy derivatives of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolines with DNA. Synthesis and identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)IQ, *Carcinogenesis*, 9: 1061-1065.

Snyderwine E, Turesky R, Turteltaub W, Davis C, Sadieh N, Schut H, Nagao M, Sugimura T, Thorgeirsson U, Adamson R, Thorgeirsson S. 1997. Metabolism of food-derived Heterocyclic Amines in nonhuman primates. *Mut. Res.* 376:203 - 10.

Sousa, J., Snyderwine, E., Turesky, R., Turteltaub, W., Davis, C., Sadieh, N., Schut, H., Nagao, M., Nath, J., Tucker, J.D., Ong, T.M., 1995. Dietary factors affecting the urinary mutagenicity assay system. I. Detection of mutagenic activity in human urine following a fried bleed. *Mut. Res.* 149, 356-374.

Speit, G., Hanlet, S., Helbig, R., Seidel, A., Hartman, A., 1996. *Toxicol. Lett.* 88, 91.

Spregelhalder B, Elsenbrand G and Preussmann R. 1980. Occurrence of volatile nitrosamines in food, a survey of the west German market. In: E.A Walker, L Gnciute Castegnaro M and Borzsoyi (eds), N-nitroso compounds: analysis, formation and occurrence, IARC. # 1: 467 - 479.

Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC, 8/27-8/32, 1995.

Stemermann, G. 1991. The pathology of breast cancer in Japanese women compared to other ethnic groups. *Breast Cancer Res. Treat.*, 18: 567-572.

Strober, W., 1991. Trypan blue exclusion test of cell viability in: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marguiles, E.M Shevach, W. Strober (Eds.),, *Current Protocols in Immunology*, Widely, New York. P. A.3.3 Appendix 3B.

Sujbert, L., Ràez, G., Szende, B., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., Török, G, 2006. Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames -test. *Toxicology*. 219, 106-112.

Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M., Kawachi, T., 1976. Overlapping of carcinogens and mutagens, in: P.N. Magee et al. (Eds). *Fundamental in Cancer Prevention*. University of Tokyo. 191-215.

Sugimura, T., 1982. A view of cancer researcher on environmental mutagens, in: H. Takebe (Ed.), *Proceedings of the Third International Conference on Environmental Mutagens*. University of Tokyo. Press/Alan R. Liss, pp. 3-20.

Sugimura, T., 2000. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*. 21, 387-395.

Sun, L.W., Qu, M.M., Li, Z.L., 2005. Toxicity evaluation of drinking water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *ACTA Scientiac Circumstantiae*. 25(3): 324-328.

Sung S, Turner L, McCarthy S, Enkemann S, Li C, Yan P, Huang T, and Yeatman T. 2005. Oncogene regulation of tumor suppressor genes in tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 26: 487 - 494.

Tachino N, Hayashi R, Liew C, Bailey G. And Dahwood R. 1995. Evidence for ras gene mutation in 1,2 amino 3 metilimidazo [4,5-f] quiniline indaced colonic aberrant crypts in the rats. *Mol. Carcinogenesis*. 12:187-192

Taylor, M.S., Setzer, R.W., DeMarini, D.M., 1995. Examination of the additivity assumption using the spiral and standard Salmonella assay to evaluate binary combinations of mutagens. *Mutat. Res*. 335, 1-14.

Thomas K, Hurst M, Matthiessen P, Sheahan D, and Williams R. 2001. Toxicity characterisation of organic contaminants in stromwaters from an agricultural headwater stream in south east England. *Wat. Res* . 35: 2411 - 2416.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vivo* and *in vitro* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutag.* 35, 206-221.

Toraason M, Butler M, Ruder A, Forrester C, Taylor L, Ashley D, Mathias P, Marlow K, Cheever K, Krieg E. and Wey H. 2003. Effect of perchloroethylene, smoking, and race on oxidative DNA damage in female dry cleaners. *Mut. Res.* 539, 9-18.

Travis LB, Li Cy, Zhang ZN, Li DG, Yin SN, Chow WH, Li LG, Dosemeci M, Blot W. Fraumeni J. 1994. Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene exposed workers in China, *Leuk Lymphoma* 14 : 91-102.

Turesky, R., Lang, N., Butler, M., Teitel, C., Kadlubar, F, 1991. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis.* 12, 1839-1845.

Umbuzeiro, G., Roubicek, D., Rech, C.M., Sato, M.I., Claxton, L. 2004. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the salmonella assay and different water extraction procedures. *Chromosphere,* 54: 1589-1597.

Ushiyama, H., Wakabayashi, K., Hirose, M., Nukaya, H., Itoh, H., Sugimura, T., Nagao, M., 1991. Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but no inpatients receiving parental alimentation. *Carcinogenesis.* 12, 1417-1422.

Urano Y. 1998. Mutagenic actives of exhaust gas and ash from sludge incineration plants. *Sci. Total Environ.* 215(1-2): 41-49.

USEPA 2000 - U.S. Environmental Protection Agency, 2000. Exposure and Human Health.

Vaghef, H., Wisen, A.C., Hellman, B., 1996. *Pharmacol. Toxicol.* 78, 37.

Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriquez, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319, 31-45.

Vargas, V.M.F., Miglivaca, S.B., Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R. Sa Ferreira, I.C.F., Pestana, M.H.D, 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metal and organic contaminants. *Mut. Res.* 490 (2001) 141-158.

Venkatachalan S, Shi Y, Jones S, Vogel H, Bradley A, Pinket D, And Donehower L. 1998. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* 17:4657-4667.

Viberg, P., Wahlund, K.G., Skog, K. 2006. On-line capillary based quantitative analysis of a heterocyclic amine in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1133: 347-352.

Voskuil D, Kampman E, Van Kraats A, Balder H, Van Muijen G, GoldBohm R, and Vant Veer P. 1999. p53 overexpression and p53 mutation in colon carcinomas: relation to dietary risk factor. *Int. J. Cancer* 81:675-681.

Wagner ED, Marengo MS, Plewa MJ. 2003. Modulation of the mutagenicity of heterocyclic amines by organophosphate insecticides and their metabolites. *Mutation Res.* 536: 103-115.

Walker, G.C., and P.P. Dobson. 1979. Mutagenesis and repair deficiencies of *Echerichia coli umuC* mutants are suppressed by the plasmid pKM101. *Mol. Gen. Genet.* 172, 17-24.

Watanabe T, Morisawa T, Mizuno T, Nukaya H, Terao Y, Tada A. Sawanishi H, Ohe T, Wakabayashi K, Hirayawa T. and Terao Y. 2003. Levels and behavior of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens in the effluent of a sewage treatment plant, *Mut. Res* 534:123 -132.

Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Tada A, Sawanishi H, Ohe T, Wakabayashi K, and Sugimura T. 2001. Synthesis of 2-phenylbenzo-triazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in waters from rivers in Japan, *Mut Res.* 498: 107 -115.

Watanabe, T., Takahashi, Y., Takahashi, T., Nukaya, H., Terao, Y., Hirayama T., Wakabayashi, K. 2002. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole type mutagens. *Mut. Res.* 519: 187-197.

Weissman N., Lome M., Beattie J. and DemetriousJ., *Clinichem.*, 7 (1971) 875

White, P.A., Rasmussen, J.B., 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410, 223-236.

White P. 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mut Res* 515:85 - 98.

Whysner J, Reddy M, Roos P, Mohan M, and Lax E. 2004. Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mut Res.* 566: 99 -130.

Williams, J.A., Stone, E.M., Millar, B.C., Gusterson, B.A., Grover, P.L., Phillips, D.H, 1998. Determination of the enzymes responsible for activation of the

heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the human breast. *Pharmacogenetics*. 8, 519-528.

Winisberg M. and Van Der Gaag M. 1992. In vivo detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory, *Sci Total Environ*. 121:95-108.

Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Canney, A.H., Loeb, L.A., 2004. Environmental and chemical carcinogens. *Semin. Cancer. Biol.* 14, 473-486.

<http://www.hydrotox.de/jpg/ames.jpg>

<http://www.intox.org/databank/documents/chemical/nitroxy>

http://www.Ueb.cas.cz/laboratory_of_mutation_genetics_Soubory/image003.jpg

Xu., Xu., Zou Huixian and Zhang J. (1997). Formation of strong mutagen 3-cloro -4-(diclorometil) -5-hidroxi (5H) - furanon (MX). By chlorination of fractions of lake water. *Water Res.* Vol.31 No 5: 1021-1026.

Yamasaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P., Shimada, T., 1992. Cytochrome p450 2E1 y 2A6 enzymes as major catalysis for metabolic activation of N - nitrosodialkylamines and tobacco related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis*. 13, 1789-1794.

Yang M, Kim S, Lee E, Cheon H, Chang S, Kang D, Choi Y, Lee S, and Jang J. 2003. Source of polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure In Non-Occupationally Exposed Koreans. *Envi. Mol. Mutagen* 42(4): 250- 258.

Yan J, Wang L, Fub P, and Yu H. 2004. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA pRiority pollutant list. *Mut Res.* 557: 99-108.

Yuan, J., Wu, X.J., Lu, W.Q., Cheng, X.L., Chen, D., Li, X.Y., Liu, A.L., W, J.J., Xie, H., Stahl, T., Sundermann, V.M. 2005. Chlorinated river and lake water extract caused oxidative damage, DNA migration and cytotoxicity in human cells. *Int. J. Hyg. Environ-healt* 208: 481-488.

Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y., Kong, Z.M., 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Elisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 108, 271-278.

Zaika L., Wasserman A., Monk C and Salay J., *J. Foods. Sci.*, 33 (1968) 53.

Zhang, G and Wang, Z., 2000. Mechanism study of the coagulant impact on mutagenic activity in water. *Wat. Res.* Vol. 34, N° 6, pp, 1781-1790.

Zhiosawa, T., Suyama, K., Nakano, K., Nukaya, H., Sawanishi, H., Oguri, A., Wakabayashi, K., Terao, Y., 1999. Mutagenic activity of 2-phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water. *Mutat. Res.* 442, 105-111.

Zhong, Y., Feng, S.L., Luo, Y., Zhang, G.D., Kong, Z.M., 2001. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong City using the *Vicia faba* micronucleus test and the comet assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 217-224.

Zhu, H., Boobis, A.R., Gooderham, N.J., 2000. The food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine activates S-phase checkpoint and apoptosis and induces gene mutation on human lymphoblastoid TK6 cells. *Cancer Res.* 60: 1283-1289.

Zuleta M y Meléndez I. 2001. Genotóxicos y carcinógenos en aguas (mini revisión). *Actualidades Biológicas* Vol. 23 # 74.

Zuleta M, Salazar J. y Adelaida G. 1990. Mutagenicidad de cinco herbicidas en *Salmonella typhimurium*, *Rev. Latinoam. Genet.*, 321-328.

Zuleta M, Valencia C, Posada L, Muñetón C, Arango O, and Meléndez I. 1994. Mutagen Formation in Three Popular Colombian Cooked Foods Effect of Supplemental Creatine and Corn Brand. *Environ Mol Mutagen* .Vol. 23, Sup. 23, p 77.

Zuleta, M., Uribe, Y., Valencia, C., Vargas, H., Orozco, L.Y., Lopez, C., 2004. Contribución de la contaminación y cloración en la Mutagenicidad, genotoxicidad y presencia de mutágenos en agua potable. *Actual. Biol.* 26, 125-136.

Zuleta, M., Orozco J., Lopez C., Naranjo C. Identification of IQ, Trip-P1, Trip-P2, MeIQx in sewage water flowing into the Pantanillo River main source of drinking water to three million residents (Enviado para publicar en 2004).

Anexo 1. Estadísticos descriptivos del IM con respecto al Sitio, Cepa, Activación metabólica y Dosis.

Variable dependiente: INDICE DE MUTACION

CSA	DOSIS	Media	Desv. tıp.	N
111	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.1917	.18552	6
	1.00	1.5500	.18708	6
	1.50	2.5333	.36148	6
	2.00	5.6783	.72874	6
	2.50	6.5150	1.06832	6
	3.00	8.2083	.52032	6
	Total	3.8110	2.79621	42
112	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.1000	.12649	6
	1.00	1.2133	.16717	6
	1.50	1.3867	.29056	6
	2.00	1.5867	.39098	6
	2.50	1.8967	.16305	6
	3.00	2.6083	.60826	6
	Total	1.5417	.59890	42
121	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.0633	.07394	6
	1.00	1.6642	.10210	6
	1.50	2.4342	.31525	6
	2.00	3.7692	.37434	6
	2.50	5.3083	.36030	6
	3.00	7.3350	.17581	6
	Total	3.2249	2.24891	42
122	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.0075	.01338	6
	1.00	1.0667	.06055	6
	1.50	1.3767	.26530	6
	2.00	2.4067	.13692	6
	2.50	3.1100	.16012	6
	3.00	3.4083	.09042	6
	Total	1.9108	.98839	42
211	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.0000	.00000	6
	1.00	1.0167	.04082	6
	1.50	1.3100	.18772	6
	2.00	1.7667	.12420	6
	2.50	2.3383	.17116	6
	3.00	2.6667	.14679	6
	Total	1.5855	.65588	42
212	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.0550	.06380	6
	1.00	1.0233	.08011	6
	1.50	1.0933	.09395	6
	2.00	1.1083	.10108	6
	2.50	1.2617	.04665	6
	3.00	1.7100	.21854	6
	Total	1.1788	.25213	42
221	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.5867	.03141	6
	1.00	1.6117	.03971	6
	1.50	1.7383	.04708	6
	2.00	2.0767	.10708	6
	2.50	3.1232	.09327	6
	3.00	3.3150	.07092	6
	Total	2.0645	.80085	42
222	.00	1.0000	.00000	6
	.50	1.1217	.04355	6
	1.00	1.2260	.02332	6
	1.50	1.2817	.05672	6
	2.00	1.4217	.04355	6
	2.50	1.6810	.03552	6
	3.00	1.9217	.04622	6
	Total	1.3791	.30589	42