



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# EFFECTO GENOTÓXICO DE LA EXPOSICIÓN A SOLVENTES ORGÁNICOS EN TRABAJADORES EXPUESTOS A PINTURAS DE CARROS EN BOGOTÁ, 2013

**Mónica Villalba Campos**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Bogotá, Colombia  
2014



# EFFECTO GENOTÓXICO DE LA EXPOSICIÓN A SOLVENTES ORGÁNICOS EN TRABAJADORES EXPUESTOS A PINTURAS DE CARROS EN BOGOTÁ, 2013

**Mónica Villalba Campos**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Bioquímica**

Directora:

PhD, Bióloga. Lilian Chuairé Noack

Codirectora I:

Ph.D, Química. Sandra Milena Rondón Lagos

Codirector II:

Ph.D, MD. Carlos Arturo Guerrero

Grupo de Investigación:

Biología Celular y Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2014



*A Dios todopoderoso y a la Mamita María, a mis Padres, especialmente a mi Madre, porque es el Ser que además de darme su total entrega y amor diariamente, también ha podido acompañarme y apoyarme en la culminación de este sueño, a mi Padre que desde el cielo está viendo los frutos de la formación que me dio y a mi hermano por su cariño y apoyo incondicional.*



## Agradecimientos

La realización y culminación de este trabajo de grado fue posible al apoyo de muchas personas, entre otras, agradezco a mi Directora de Tesis Lilian Chuaire por su soporte incondicional, a las Doctoras Milena Rondón, Sandra Ramírez, Carolina Sánchez, María Martínez, *Universidad del Rosario*, a los Doctores Fredy Mesa, *Universidad del Rosario*, Mauricio Quimbaya, *Pontificia Universidad Javeriana* y Adriana Olarte, *Universidad Nacional de Colombia*, por su valiosa guía y colaboración, tanto en la consecución de los individuos del grupo que conformó el estudio piloto así como en el desarrollo de las técnicas empleadas en este estudio.

De igual forma agradezco a las personas que ofrecieron su apoyo moral y espiritual, a todas mis grandes amigas, a Lida Triviño, *Universidad del Rosario*, Elizabeth Vargas, *Universidad del Rosario*, Luis Carlos Salazar, *Universidad del Rosario*, Yina Carrillo, *Clínica Universitaria Colombia*, Amparito y las Doctoras Dora Ríos y María Antonia Gaona, de la Unidad de Microbiología de la *Universidad del Rosario*, Milciades Ibáñez, *Universidad del Rosario* y a todos aquellas personas que me acompañaron.

Para finalizar, le doy mi agradecimiento a la *Universidad del Rosario* porque sin el apoyo que me brindó este sueño no se hubiera materializado.

## Resumen

Un individuo está ocupacionalmente expuesto a un determinado compuesto químico cuando, en su lugar de trabajo, su organismo lo inhala o lo absorbe. Es el caso de los trabajadores de los talleres de pinturas de carros, quienes están expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) utilizados entre otras cosas, para preparar mezclas de pinturas.

De acuerdo a los estudios efectuados sobre este problema de salud pública, la exposición ocupacional a las pinturas y en particular a los solventes, puede causar un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer en diversos órganos, como lo son, pulmón, vejiga y páncreas y, tumores linfáticos y hematopoyéticos. Según la IARC (International Agency for Research on Cancer), la exposición ocupacional a las pinturas está incluida en el grupo-1 de agentes carcinógenos, lo que confirma que el riesgo de ciertos tipos de cánceres aumenta con este tipo de actividad.

La escasa información disponible sobre los efectos genotóxicos asociados con la exposición ocupacional a pinturas por parte de la población de trabajadores de talleres de lámina y pintura de vehículos automotores del barrio 7 de agosto, localidad Barrios Unidos de la ciudad de Bogotá, sumada a la evidencia asociada sobre riesgo de cáncer en las personas expuestas, justificó la realización del presente estudio, cuyo objetivo consistió en evaluar el daño en el ADN causado por la exposición a los solventes orgánicos contenidos en las pinturas de vehículos automotores, mediante la realización de tres ensayos, en primer lugar, se realizó la cuantificación del ADN libre contenido en el suero proveniente de sangre periférica por medio del método de fluorescencia usando *SYBR-Gold*, también se llevó a cabo el ensayo cometa o ensayo de electroforesis en gel de células individuales y la evaluación de anomalías cromosómicas por medio de análisis citogenético convencional. En el presente estudio, se hallaron diferencias en la magnitud del daño del material genético, en cuanto a la frecuencia de anomalías cromosómicas, un aumento en la concentración de ADN libre circulante y la frecuencia de cometas 3 y 4, entre el grupo de individuos expuestos y el grupo no expuesto.

El potencial clínico de nuestros resultados permitirá que sean tenidos en cuenta como posibles herramientas diagnósticas de daño genotóxico en personas ocupacionalmente expuesta a los solventes orgánicos contenidos en la pintura de carros.

**Palabras clave:** Exposición ocupacional a solventes, genotoxicidad, ADN libre circulante, aberraciones cromosómicas.

## Abstract

An individual is occupationally exposed to a particular chemical compound when, in your workplace, your body inhaled or absorbed. This is the case of workers in the workshops of paintings of cars, who are exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) used inter alia for preparing mixtures of paints.

According to studies done on this public health, occupational exposure to paints and solvents in particular, can cause an increased risk of developing cancer in various organs, such as, lung, bladder and pancreas and, lymphatic and hematopoietic tumors. According to the IARC (International Agency for Research on Cancer), occupational exposure to paints is included in group 1 carcinogens, which confirms that the risk of certain cancers increases with this type of activity.

The limited information available on the genotoxic effects associated with occupational exposure to paintings by the population of workers in film and painting workshops of motor vehicles district August 7 , Barrios Unidos locality of Bogotá , together with the evidence he associated on cancer risk in exposed persons , justified the embodiment of the present study that aimed to assess the DNA damage caused by exposure to organic solvents in paints of motor vehicles, by conducting three trials , first, the quantification of free DNA in the serum from the peripheral blood by the method of fluorescence using SYBR -Gold was performed, was performed the comet assay or gel electrophoresis assay of individual cells and evaluation chromosomal abnormalities by conventional cytogenetic analysis . In the present study, differences in the extent of damage of the genetic material found in the frequency of chromosome abnormalities, increased circulating free DNA concentrations and frequency of kites 3 and 4, the group of individuals exposed and the control group.

The clinical potential of our results will allow to be taken into account as potential diagnostic tools of genotoxic damage in persons occupationally exposed to organic solvents contained in paint cars.

**Keywords:** Occupational exposure to solvents, genotoxicity, free circulating DNA, cromosome aberrations.



# Contenido

	Pág.
Resumen .....	VIII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XV
Lista de abreviaturas.....	XVI
Introducción.....	1
<b>1. Formulación del problema y Justificación .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
2.1 Objetivo General.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
<b>3. Marco Teórico.....</b>	<b>9</b>
3.1 Agentes genotóxicos.....	9
3.1.1 Absorción a través del tracto respiratorio .....	9
3.1.2 Absorción a través del tracto gastrointestinal .....	10
3.1.3 Absorción percutánea .....	10
3.2 Biomarcadores.....	12
3.3 ADN libre circulante .....	13
3.4 Aberraciones cromosómicas.....	14
3.4.1 Aberraciones cromosómicas estructurales .....	15
3.4.2 Aberraciones cromosómicas numéricas .....	20
<b>4. Metodología .....</b>	<b>22</b>
4.1 Tipo de estudio .....	22
4.2 Tamaño de la muestra .....	22
4.3 Selección de los grupos de estudio.....	22
4.4 Criterios de inclusión y exclusión .....	23
4.5 Evaluación de daño genotóxico .....	23
4.5.1 Obtención de las muestras de sangre .....	23
4.5.2 Aislamiento de linfocitos.....	23
4.5.3 Prueba de citotoxicidad por exclusión con azul de <i>trypan</i> .....	24
4.5.4 Ensayo Cometa.....	24
4.6 Evaluación de daño cromosómico mediante detección de aberraciones cromosómicas con bandas G .....	26

4.6.1	Cultivo de sangre periférica .....	26
4.6.2	Cariotipo .....	26
4.6.3	Bandeo G con colorante Giemsa .....	27
4.7	Ensayo de cuantificación de ADN libre por fluorescencia .....	27
<b>5.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>29</b>
5.1	Hipótesis nula.....	29
5.2	Hipótesis alterna.....	30
5.3	Variables .....	30
<b>6.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>31</b>
6.1	Caracterización del grupo de estudio .....	31
6.2	Ensayo cometa.....	33
6.2.1	Prueba de citotoxicidad por exclusión con <i>azul de trypan</i> .....	33
6.2.2	Determinación del tipo de cometa.....	33
6.3	ADN libre circulante por fluorescencia.....	37
6.3.1	Curva estándar de calibración .....	37
6.4	Evaluación del daño cromosómico mediante detección de aberraciones cromosómicas con bandas G.....	45
6.4.1	Frecuencia de fragilidades.....	47
6.4.2	Aberraciones numéricas .....	48
6.4.3	Aberraciones estructurales .....	48
6.4.4	Roturas.....	49
6.4.5	Cariogramas .....	50
6.5	Relación entre el daño genotóxico y el tiempo de exposición a solventes .....	53
<b>7.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>56</b>
7.1	Tamaño de la muestra.....	56
7.2	Cuantificación de daño genotóxico por ensayo cometa .....	56
7.3	ADN libre circulante por fluorescencia.....	58
7.4	Evaluación del daño cromosómico mediante detección de aberraciones cromosómicas con bandas G.....	60
<b>8.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>65</b>
8.1	Conclusiones.....	65
8.2	Recomendaciones.....	65
	<b>A. Anexo: Software Comet Score .....</b>	<b>67</b>
	<b>B. Anexo: Parámetros evaluados en software Comet Score en ensayo cometa para el grupo expuesto.....</b>	<b>68</b>
	<b>C. Anexo: Parámetros evaluados en software Comet Score en ensayo cometa para el grupo no expuesto .....</b>	<b>69</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>71</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 3-1:</b> Deleción final. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008.....	15
<b>Figura 3-2:</b> Cromosoma en anillo. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008.....	16
<b>Figura 3-3:</b> Duplicación. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008.....	16
<b>Figura 3-4:</b> Cromosoma dicéntrico. Tomado de: Cytogenetics Information Site. Dave McDonald. Estados Unidos, 2008.....	17
<b>Figura 3-5:</b> Isocromosoma. Tomado de: Monografía: Cromosomas y enfermedades. Anomalías cromosómicas. En línea, 2004.....	17
<b>Figura 3-6:</b> Inversión pericéntrica. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008.....	18
<b>Figura 3-7:</b> Translocación recíproca. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008.....	19
<b>Figura 4-1:</b> Clasificación visual de los tipos de cometas. Imágenes de cometas de linfocitos de los individuos que conforman el grupo de estudio, teñidos con SYBR-Green. ....	25
<b>Figura 6-1:</b> Imagen de los componentes de un cometa. Tomado de Singh <i>et al.</i> (1988).33	33
<b>Figura 6-2:</b> Cometas obtenidos de linfocitos tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
<b>Figura 6-3:</b> Cometas obtenidos de linfocitos de un individuo del grupo no expuesto .....	34
<b>Figura 6-4:</b> Cometas obtenidos de linfocitos de un individuo del grupo expuesto .....	34
<b>Figura 6-5:</b> Porcentaje de tipos de cometas del grupo expuesto.....	35
<b>Figura 6-6:</b> Porcentaje de tipos de cometa del grupo no expuesto .....	36
<b>Figura 6-7:</b> Valores de fluorescencia para las diluciones del estándar de ADN.....	38
<b>Figura 6-8:</b> Relación fluorescencia/concentración de ADN estándar .....	38
<b>Figura 6-9:</b> Niveles de ADN libre en suero del grupo expuesto .....	40
<b>Figura 6-10:</b> Niveles de ADN libre en suero del grupo no expuesto .....	41
<b>Figura 6-11:</b> Visualización de las diluciones seriales del estándar de ADN. Carril 1: Solución madre de ADN, carriles 2-4 y 6-7: Diluciones seriales del ADN (5:10), carril 5: Marcador de peso. ....	43
<b>Figura 6-12:</b> Visualización de los sueros. Carril 1-7: Control negativo: Sueros tratados con DNasa-I, carriles 9-21 sueros del grupo expuesto (1-32), carril 8 y 30: Marcador de peso.....	43

- Figura 6-13:** Visualización de los sueros. Carril 42: Suero expuesto 33. Carril 43-51 y 53-70 y 72-77: Sueros del grupo no expuesto (1-33). Carriles 52 y 71: Marcador de peso. Carriles 78-81 Control positivo: Sueros tratados con RNasa..... 44
- Figura 6-14:** Cariograma normal. 46XY, fra(9)(q12) individuo expuesto. .... 51
- Figura 6-15:** Monosomía. 45XY, -18, individuo expuesto..... 51
- Figura 6-16:** Translocación. 46, XY, der(7)t(7;14)(q32;q22), individuo expuesto..... 52
- Figura 6-17:** Rotura. 46, XY, chtb(16)(p11.1), individuo expuesto. .... 52

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 6-1:</b> Caracterización del grupo expuesto y el grupo no expuesto.....	31
<b>Tabla 6-2:</b> Hábitos personales de los grupos de estudio .....	32
<b>Tabla 6-3:</b> Estadísticos descriptivos del ensayo cometa para los dos grupos de estudio .....	36
<b>Tabla 6-4:</b> Relación valores fluorescencia promedio y concentración de las diluciones seriales del estándar de ADN de esperma de salmón .....	39
<b>Tabla 6-5:</b> Valores de ADN libre circulante en individuos expuestos y no expuestos ..	39
<b>Tabla 6-6:</b> Valores de referencia para el ADN libre circulante. Tomado de Douvdevani <i>et al</i> (2009) .....	41
<b>Tabla 6-7:</b> Estadísticos descriptivos del ensayo ADN libre circulante para los dos grupos de estudio.....	42
<b>Tabla 6-8:</b> Resumen complementos cromosómicos del Grupo expuesto .....	45
<b>Tabla 6-9:</b> Resumen complementos cromosómicos del Grupo No expuesto.....	46
<b>Tabla 6-10:</b> Frecuencia fragilidades Grupo expuesto y No expuesto .....	47
<b>Tabla 6-11:</b> Comparación frecuencia fragilidades por número de individuos .....	48
<b>Tabla 6-12:</b> Comparación frecuencia aberraciones numéricas .....	48
<b>Tabla 6-13:</b> Comparación frecuencia aberraciones estructurales .....	49
<b>Tabla 6-14:</b> Frecuencia de roturas Grupo expuesto y No expuesto .....	50
<b>Tabla 6-15:</b> Estadísticos descriptivos de la determinación de aberraciones cromosómicas para los dos grupos de estudio .....	53
<b>Tabla 6-16:</b> Estadísticos descriptivos de la determinación de correlación daño en el ADN expuestos (ANDIc) – Tiempo de exposición.....	54
<b>Tabla 6-17:</b> Estadísticos descriptivos de la determinación de correlación daño en el ADN expuestos – hábitos. ....	54
<b>Tabla 6-18:</b> Valores de solventes en el aire de talleres de pinturas de carros, barrio 7 de agosto, Bogotá. ....	55
<b>Tabla 6-19:</b> Valores de referencia para solventes en aire. Fuente: ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). 2011. TLVs and BEIs for Chemical Substances and Physical Agents.....	55

# Lista de abreviaturas

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>add</i>	Adición de material de origen desconocido
<i>chtb</i>	Rotura de cromátide
<i>del</i>	Delección
<i>der</i>	Cromosoma derivado
<i>fra</i>	Locus frágil
<i>inv</i>	Inversión
<i>i o iso</i>	Isocromosoma
<i>Signo (+)</i>	De más o ganancia
<i>Signo (-)</i>	Pérdida
<i>t</i>	Translocación
<i>?</i>	Inicierto

# Introducción

De acuerdo con estudios previos, se ha establecido que la exposición ocupacional a las pinturas puede causar un incremento en el riesgo de aparición de diferentes tipos de cáncer en órganos como pulmón, vejiga y páncreas, así como tumores linfáticos y hematopoyéticos (Lundberg *et al* 1998; Brown *et al* 2002).

Según reportes de la IARC (International Agency for Research on Cancer) que abarcan el período 1989-2010, los trabajadores de este sector de la industria están potencialmente expuestos a diferentes sustancias químicas presentes en las pinturas y en forma especial, a solventes orgánicos, en operaciones que requieren manipulación manual como son, procesos de disolución, filtrado, limpieza y aplicación de barnices, entre otros (ver tabla I.1). La inhalación y el contacto cutáneo son las principales rutas de exposición a los solventes, mientras que la ingestión, otra ruta potencial de entrada, está relacionada con los hábitos personales de cada trabajador.

De acuerdo con la IARC, la exposición ocupacional a las pinturas, está incluida dentro del grupo 1 de carcinógenos (ver tabla I.2), que comprende a los agentes físicos o químicos con capacidad directa de provocar cáncer. Sin embargo, el acervo actual de evidencia epidemiológica acerca del efecto de la exposición ocupacional a las pinturas no permite identificar los agentes cancerígenos específicos asociados.

La escasa información disponible acerca de los efectos genotóxicos asociados con la exposición a pinturas muestra diversidad de resultados. A este respecto, Cárdenas-Bustamante *et al* 2007 examinaron la posible relación entre el grado de exposición a solventes orgánicos y los consecuentes efectos genotóxicos, en trabajadores de la industria de pinturas de Bogotá, mediante el monitoreo citogenético de micronúcleos y el ensayo cometa. Ellos no encontraron diferencias estadísticas en estos biomarcadores genéticos analizados, entre los trabajadores expuestos y los no expuestos. Por su parte, De Oliveira *et al* 2011, mediante un estudio similar llevado a cabo en trabajadores de pinturas de Brasil, si bien no hallaron diferencias estadísticas en cuanto al biomarcador micronúcleos entre los individuos expuestos y los no expuestos, con el ensayo cometa, sin embargo, observaron que tanto el índice como la frecuencia de daño en el ADN fueron significativamente mayores en el grupo expuesto.

**Tabla I.1. Contenido de disolvente típico de las pinturas y materiales de revestimiento en el oeste de Europa, 2006.**

Coating material	Solvent content in %
Coating powders, silicate paints	0
Emulsion paints for interior use	0.2
Emulsion paints for exterior use, plasters	3-5
Electrodeposition coatings	1-5
Latex coatings (environment-friendly)	5-9
Waterborne coatings (industrial)	3-18
High-solids coatings	20-35
General medium-solids and low-solids paints/coatings	40-50
Dilutions, thinners, cleaning agents for solvent-borne coatings	100
for waterborne coatings	0-50
Compiled by the Working Group	

Fuente: IARC (International Agency for Research on Cancer). Occupational exposure as a painter. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans IARC. 2010

**Tabla I.2. Clasificación de agentes según la IARC**

CAS No	Agent	Group	Volume	Year
016543-55-8	N'-Nitrosornicotine (NNN) and 4-(N-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	1	89, 100E	2012
064091-91-4	(NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)			
	<i>Opisthorchis viverrini</i> (infection with)	1	61, 100B	2012
	Painter (occupational exposure as a)	1	47, 98, 100F	2012

Fuente: IARC (International Agency for Research on Cancer). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–108.

Debido a que en la mayoría de talleres de pintura de vehículos automotores de Bogotá, no existen condiciones adecuadas de trabajo, en cuanto a ventilación y uso de los equipos de protección personal, los trabajadores que laboran en este sector de la industria están expuestos en forma permanente a solventes y a los múltiples compuestos que ellos utilizan para preparar sus propias mezclas, con el riesgo que este hecho acarrea, en razón de las propiedades mutagénicas y carcinogénicas exhibidas por este tipo de sustancias.

En la actualidad, se dispone de algunos estudios epidemiológicos sobre la exposición ocupacional a solventes y la aparición de diversas patologías como el cáncer, entre los que

se encuentra el trabajo de Zhang *et al* 2013, quienes hallaron evidencia de que las variaciones genéticas del tipo de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen *IL10* (interleucina 10), involucrado con la respuesta inmune, podrían modificar la asociación entre la exposición ocupacional a los solventes y el riesgo de desarrollo de linfoma no-Hodgkin del tipo linfoma difuso de células B grandes, en mujeres ocupacionalmente expuestas a solventes orgánicos, teniendo en cuenta que las variaciones en dicho gen pueden afectar la respuesta inmuno-reguladora asociada con procesos inflamatorios y apoptóticos, así como con la aparición de tumores linfoides. También, Ángela Moro *et al* 2012 evaluaron el efecto genotóxico y el daño oxidativo en pintores expuestos a bajas concentraciones de tolueno (componente principal del thinner usado como disolvente de pinturas), mediante los ensayos cometa y micronúcleos. Ellos observaron que, a pesar de los bajos niveles de solvente, el índice de daño en el ADN fue elevado y hubo además alteraciones en ciertas enzimas hepáticas asociadas con especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que sugiere que el estrés oxidativo está asociado con patologías como el cáncer y los desórdenes neurodegenerativos. Otros estudios epidemiológicos han reportado un incremento significativo del riesgo de desarrollar cáncer de órganos del aparato respiratorio (pulmón y nasofaríngeo), así como de riñón, vejiga urinaria y leucemia en personas ocupacionalmente expuestas a tolueno, formaldehído y solventes. (Svensson *et al* 1990; León *et al* 1994; Yang *et al* 2001).

Debido a que el promedio del periodo de latencia entre el momento de inicio de la exposición hasta el diagnóstico de las enfermedades asociadas es de 10 a 11 años, es necesario implementar pruebas diagnósticas que permitan la detección temprana de este tipo de patologías y la ejecución de medidas preventivas (Instituto Nacional de Cancerología, 2011).

Con base en la evidencia epidemiológica que relaciona la exposición de solventes orgánicos presentes en las pinturas de automotores con el desarrollo de cáncer y otras enfermedades, se planteó el presente estudio, con el objetivo de evaluar el efecto genotóxico de dichos solventes en los linfocitos de sangre periférica de trabajadores expuestos en talleres de pintura de vehículos automotores de la localidad de Barrios Unidos de la ciudad de Bogotá. Para este efecto, se realizaron ensayos de genotoxicidad y daño de ADN, como la cuantificación de ADN libre circulante, el ensayo cometa y la evaluación de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas.



# 1. Formulación del problema y Justificación

La capacidad de inducir daño en el material genético por parte de un agente genotóxico, no solo está determinada por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, sino también por la constitución genética del individuo, factores que, en conjunto, pueden definir una susceptibilidad propia o particular. Como agentes genotóxicos de origen químico pueden considerarse los contaminantes ambientales, como los metales pesados y algunos hidrocarburos aromáticos. A este respecto, el oficio en talleres de pintura de vehículos automotores está involucrado en la problemática de salud pública generada por la exposición a los solventes orgánicos, lo que incluye, tanto la exposición como la manipulación diaria de sustancias como thinner, gasolina y pintura. En particular, la exposición a la pintura genera un mayor riesgo pues, además de solventes, contiene material sólido, plomo y resinas, entre otros.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2001) describe al thinner y a las pinturas de vehículos automotores como mezclas complejas de solventes orgánicos, en las que se hallan diversidad de compuestos químicos como xileno, metanol, tolueno, benceno, cloruro de metileno, acetona e hidrocarburos policíclicos aromáticos PAHs (metil, isobutil, cetona, 1, 1, 1-tricloro-etano), entre otros. Muchas de estas sustancias causan daño irreparable en el ADN, lo que ha llevado a considerarlos como potentes agentes mutágenos, clastógenos, carcinógenos y teratógenos (Swanepoel 2004). El benceno exhibe propiedades hemotóxicas, inmunotóxicas, citotóxicas y genotóxicas (Swanepoel 2004) y ha sido asociado con el desarrollo de leucemia (Zhu y Jiang 2001). Los PAHs, por su parte, son sustancias altamente cancerígenas en seres humanos y en otras especies animales (Swanepoel 2004).

En este orden de ideas y considerando los reportes de la IARC que clasifican la labor de pintura de vehículos como un proceso industrial carcinogénico, es indudable que la exposición ocupacional a los solventes orgánicos contenidos en la pintura constituye una problemática de salud pública a nivel mundial. Los efectos adversos producidos por los solventes pueden ser explicados con base en propiedades como su bajo peso molecular y su carácter apolar, que los hace afines por los tejidos ricos en grasas, como el sistema nervioso.

En adición, sus propiedades físico-químicas, como la elevada presión de vapor (volatilidad) y el bajo punto de ebullición, facilitan su absorción (Axelson y Hogstedt 1994, Snyder y Andrews, 1996, Löf y Johanson 1998). Una vez ingresan al cuerpo, los solventes son sometidos a reacciones metabólicas detoxificadoras (citocromo CYP450, epóxido hidrolasa EPHXs), que tienen como finalidad solubilizarlos para permitir su excreción a través de la orina. Dichas reacciones dan origen a productos intermedios, aún más tóxicos que el compuesto parental (bioactivación), como los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Costa *et al* 2006, Mattia *et al* 1991), que provocan lesiones primarias en el ADN (aductos), debido a que se pueden unir a sus centros nucleofílicos mediante enlaces covalentes (Heuser *et al* 2007). Las implicaciones biológicas de las lesiones causadas por los solventes orgánicos dependen de la eficiencia en la reparación. En caso de que no puedan ser reparadas, las lesiones podrían fijarse para dar origen a mutaciones en células somáticas y/o en células germinales y provocar así enfermedades como el cáncer (Bonassi 2001).

En Colombia, la problemática de exposición reviste una mayor complejidad, asociada con el hecho de que la gran mayoría de los talleres de pintura de vehículos automotores laboran bajo condiciones de informalidad, condición que explica la pobre capacidad de acceso a los servicios médicos especializados en la prevención de riesgos de salud y en el tratamiento de las enfermedades generadas.

En adición, el bajo nivel de escolaridad de los pintores también explica, al menos en parte, su desconocimiento acerca de las medidas necesarias de protección, así como de las consecuencias de la exposición a los solventes orgánicos sobre su estado de salud. En estos talleres de pintura se manipulan las sustancias de más bajo precio en el mercado las que, en razón de que no se ajustan a los estándares nacionales o internacionales de calidad, son más nocivas para los trabajadores. Aún más alarmante resulta el hecho de que algunos pintores deciden fabricar sus propios insumos de trabajo, mezclando varias clases de thinner o de pinturas por ejemplo, con el fin de conseguir mejores resultados, o de que los turnos de trabajo pueden ser extremadamente largos, superando incluso las 12 horas diarias, condiciones que también incrementan los riesgos de la exposición.

Los argumentos expuestos justifican en forma suficiente la necesidad de caracterizar las condiciones de salud y trabajo en los individuos ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos de pinturas, empleados en talleres de la localidad de Barrios Unidos de la ciudad de Bogotá, mediante la determinación de biomarcadores sensibles de genotoxicidad, que probablemente, permitirán evaluar enfermedades progresivas cuyos síntomas se manifiestan tras un largo periodo de exposición.

Nuestro propósito es también alertar sobre la posible aparición y magnitud de daños genéticos precoces, así como determinar el riesgo de problemas de salud a largo plazo y formular acciones preventivas encaminadas a la promoción de la salud y a la sustentación de una mejor calidad de vida, tanto para la población objeto de estudio, como para sus cónyuges e hijos.

Por otro parte, esperamos que nuestros hallazgos constituyan el punto de inicio de ulteriores estudios que tengan como objetivo determinar los diversos mecanismos mediante los cuales los solventes afectan las vías de señalización involucradas en la reparación del material genético.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar los efectos genotóxicos de la exposición ocupacional a solventes orgánicos en trabajadores de talleres de pintura de carros de la localidad de Barrios Unidos de Bogotá.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.1** Con base en el grado de dispersión del ADN, cuantificar el daño genotóxico en los individuos expuestos a solventes orgánicos.
- 2.2** Determinar la concentración de ADN libre circulante en los individuos expuestos a solventes orgánicos.
- 2.3** Determinar el efecto clastogénico de la exposición ocupacional a solventes.
- 2.4** Determinar la relación entre la cuantificación de daño genético y el tiempo de exposición ocupacional a los solventes orgánicos.



## **3. Marco Teórico**

### **3.1 Agentes genotóxicos**

Un agente genotóxico o xenobiótico es una sustancia de origen químico, físico o biológico, con la capacidad de producir daño en el material genético, lo que incluye tanto al ADN como a las proteínas involucradas en los procesos de reparación, condensación y des-condensación de los cromosomas, entre otros. Miles de empleados de empresas del sector de las pinturas están expuestos en forma rutinaria a productos químicos peligrosos en sus lugares de trabajo, especialmente a los solventes orgánicos, agentes que pueden encontrarse en forma de gas, humo o dispersión sólida (Tong-man y Nagalakshmi 1999).

Las pinturas de los vehículos automotores en particular, están constituidas por pigmentos muy finos suspendidos en un líquido que contiene ligantes o resinas, solventes volátiles o agua y aditivos que imparten características especiales. Los solventes actúan en realidad como agentes genotóxicos que pueden ingresar al organismo a través de diversas vías, como el tracto respiratorio (por inhalación del aire contaminado), el tracto gastrointestinal (por ingestión de comida y bebida contaminadas) y la piel o vía percutánea.

#### **3.1.1 Absorción a través del tracto respiratorio**

El epitelio de la región nasofaríngea del tracto respiratorio absorbe fácilmente los tóxicos hidrófilos, debido a que está recubierto por una película de agua. Los tóxicos lipófilos se absorben parcialmente, sobre todo en los alvéolos, mediante difusión a través de la barrera constituida por el epitelio alveolar y el endotelio capilar. En los alvéolos, los tóxicos pasan al torrente sanguíneo, donde pueden disolverse en la fase líquida o pueden unirse a las células sanguíneas y/o a los componentes del plasma, en función de su afinidad química o por adsorción. La sangre contiene un 75% de agua, lo que hace que los gases y vapores hidrófilos, como los alcoholes, sean muy solubles en el plasma. Los tóxicos lipófilos, como el benceno, suelen unirse a células o a macromoléculas como la albúmina.

### 3.1.2 Absorción a través del tracto gastrointestinal

Algunos compuestos genotóxicos pueden ingresar al organismo por deglución accidental, por consumo de alimentos y bebidas contaminadas o por deglución de partículas procedentes del tracto respiratorio.

Algunos iones metálicos tóxicos utilizan sistemas de transporte especializados para elementos esenciales. Así, el cobalto y el manganeso -empleados como pigmentos o secantes en las pinturas- utilizan el sistema del hierro mientras que el plomo, al parecer, utiliza el sistema de transporte del calcio. Los tóxicos y/o los metabolitos polares son excretados a través de la bilis hacia el duodeno, donde son hidrolizados por las enzimas secretadas por la microflora. En el caso de los tóxicos que sufren biotransformación en el hígado hacia metabolitos menos tóxicos o no tóxicos, la ingestión puede ser una vía de entrada menos peligrosa.

### 3.1.3 Absorción percutánea

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Dentro de sus funciones está la de actuar como barrera protectora que aísla al organismo del medio externo, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras. Consta de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. Desde el punto de vista toxicológico, la más importante es la epidermis, pues está recubierta por una capa lipídica que actúa como barrera protectora, aunque puede ser atravesada por los folículos pilosos y por los conductos de las glándulas sudoríparas. Por esta razón, la absorción percutánea puede efectuarse mediante difusión de sustancias lipofílicas como los solventes orgánicos a través de esta capa y, en menor proporción, de algunas sustancias hidrofílicas a través de los poros.

La absorción también puede ocurrir a través de la piel, en caso de lesiones mecánicas, térmicas o químicas o por enfermedades cutáneas. En esos casos, se produce una horadación de las capas de la piel, incluida la barrera lipídica, lo que abre la puerta a la entrada de agentes tóxicos y nocivos (Dušan Djuric *et al* 1998).

En la década de los 80, se demostró que muchos agentes químicos pueden provocar alteraciones genéticas en las células somáticas y/o germinales de los trabajadores expuestos, con la consecuente aparición de cambios heredables en línea germinal o de génesis de diversas enfermedades, como el cáncer, a nivel de las células somáticas. Este hecho hizo evidente que dichos agentes tenían la capacidad de interactuar con los ácidos nucleicos en forma directa o indirecta y que además tenían propiedades carcinogénicas, cuando las alteraciones se producían en proto-oncogenes o en genes

supresores de tumores, en razón de su participación en el control del crecimiento celular y la diferenciación (Alberghini *et al* 1983; Little *et al* 1989; Brandt 1992).

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos. Así, el agente xenobiótico hace su entrada al organismo a través de diversas vías, a continuación se distribuye a través del líquido tisular y de la sangre, para finalmente ingresar a la célula a través de su membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, el agente químico puede actuar en forma directa o bien, puede ser activado por enzimas metabólicas, en cuyo caso su acción es de tipo indirecto y se llama promutágeno. Después de interactuar con el ADN, se pone en marcha la maquinaria de reparación del ADN lesionado. En caso de que este no pueda ser reparado, el daño genético se fijará y expresará en las diferentes estirpes celulares (Rodríguez 1995).

Los órganos y tejidos más vulnerables a los efectos de los agentes genotóxicos son los que presentan un grado elevado de perfusión vascular o suministro de sangre, pues están en capacidad de captar rápidamente concentraciones altas de tóxicos. Por su parte, los tejidos menos perfundidos lo hacen en forma más lenta. En este caso, la permanencia y acumulación de los tóxicos es mayor, lo que aumenta el riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer.

Estudios realizados acerca de los efectos genotóxicos del benceno, indican que este agente clastógeno genera rupturas y aberraciones cromosómicas en los linfocitos de sangre periférica (US Department of Health and Human Services 1997). Otra evidencia de su genotoxicidad fue la encontrada por Lee *et al* 1988, quienes demostraron que el benceno inhibe la síntesis de ADN en las células de la médula ósea.

El National Institute for Occupational Safety and Health de los Estados Unidos de Norteamérica (NIOSH 1983) estimó que un número de 1.278.000 trabajadores estuvieron expuestos al tolueno entre 1981 y 1983 en ese país. El tolueno es utilizado ante todo en la producción de benceno mediante un proceso de hidrodeshalquilación térmica. Su segundo mayor uso corresponde a aplicaciones de solventes, especialmente la pintura y la industria de los recubrimientos. También se utilizan cantidades significativas de tolueno en tintas, adhesivos y en la industria del cuero (IARC 1981). Fumes-Cravioto *et al* 1977 reportaron un gran número de aberraciones cromosómicas en los linfocitos de trabajadores suecos expuestos a tolueno. Bauchinger *et al* 1982 por su parte, reportaron aumento de la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (SCE), intercambios y roturas de cromátides y gaps en los linfocitos periféricos de trabajadores expuestos a tolueno en Alemania.

Aunque no se conoce cuál es la frecuencia de cáncer atribuible a exposición laboral, diferentes autores han realizado estimaciones del riesgo asociado. En Estados Unidos, el 4% de los casos de cáncer ocurren como consecuencia de la exposición ocupacional (Doll y Peto 1981) mientras que, en España, las frecuencias de mortalidad masculina y femenina debida a cáncer generado por exposición laboral son 6% y 0.9% respectivamente (González y Agudo 1999).

Desde el punto de vista preventivo, la identificación temprana de los efectos adversos ocasionados por la exposición ocupacional a agentes genotóxicos como los solventes es de suma importancia, si se tiene en cuenta que cuando se evitan o limitan los primeros efectos (magnitud y carácter agudo o crónico de la exposición), es posible prevenir una mayor severidad o gravedad de dichos efectos. Además, considerando que las exposiciones profesionales pueden ser evitadas y que la exposición usualmente ocurre en forma no voluntaria, nadie está obligado a aceptar un mayor riesgo de cáncer en el trabajo, en particular si la causa es conocida.

### **3.2 Biomarcadores**

Un biomarcador es, en un sentido amplio, la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico o también el conjunto de alteraciones inducidas por el mismo sobre componentes celulares o bioquímicos o también sobre procesos, estructuras o funciones propias de un organismo vivo. En cualquier caso, los biomarcadores son cuantificables en un sistema biológico o en una muestra (Entox y Tiwet 1996) y son de suma utilidad para evaluar los síntomas asociados con enfermedades progresivas que se desarrollan tras un largo periodo de exposición, como el cáncer. En general, se clasifican en tres grupos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad.

Se considera que los biomarcadores de exposición son los que permiten medir la dosis interna mediante el análisis químico del compuesto tóxico o un metabolito del mismo en los fluidos corporales, mientras que los denominados de susceptibilidad sirven como indicadores de la respuesta individual frente a la agresión de un tóxico o de un grupo de tóxicos. Por su parte, los biomarcadores de respuesta o de efecto indican cambios bioquímicos que acontecen tras la exposición a xenobióticos y que incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARNm, aumento de determinadas proteínas e incluso aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico (Gil 2000).

### 3.3 ADN libre circulante

Las moléculas de ADN libre circulante (ADNlc) están constituidas por cadenas sencillas o dobles, con una longitud que oscila entre 500 y 21000 pb. El ADNlc está presente en la sangre, aunque también circula en otros líquidos corporales como el amniótico, el pleural, el sinovial y la orina. Se ha encontrado que los pacientes con cáncer o con otro tipo de enfermedades, como artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, infecciones bacterianas (tuberculosis) y virales (hepatitis), embolismo pulmonar y otras condiciones como el infarto y el embarazo, presentan niveles elevados de ADNlc.

A pesar de más de 30 años de investigación sobre este tópico, aún no está claro cuál es el origen del ADNlc. En 1948, Mandel y Metais describieron por primera vez la presencia de ADNlc en sangre humana. A pesar de la importancia de este descubrimiento y de que en la década de los 60 se encontró ADN extracelular en suero y en plasma de personas con lupus eritematoso sistémico, no se le dio importancia a este hecho sino hasta 1994, cuando fue redescubierto después de detectar fragmentos de genes RAS mutados en la sangre de pacientes con cáncer (Sorenson *et al* 1994). La presencia de elevadas concentraciones de ADNlc en la sangre de pacientes con cáncer le confiere un valor adicional como potencial biomarcador sanguíneo (Stroun *et al* 2000).

La detección de ADNlc en plasma o suero podría servir como una "biopsia líquida" de utilidad para numerosas aplicaciones diagnósticas, lo que tendría como ventaja en no tener que tomar biopsias del tejido tumoral. Sin embargo, los niveles de ADNlc también podrían reflejar procesos fisiológicos y patológicos que no son específicos de tumores, como las enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y trauma de tejidos. No obstante, el análisis de ADNlc podría permitir la detección de alteraciones genéticas y epigenéticas relacionadas con los tumores, con relevancia para el desarrollo y la progresión del cáncer.

Se ha demostrado además que procesos como la apoptosis o la necrosis no son la principal fuente de ADNlc pues también puede ser liberado en forma activa por las células vivas. Por otro lado, el desequilibrio entre la liberación del ADNlc desde las células vivas y los mecanismos utilizados para la remoción del mismo, pueden desempeñar un papel importante en la aparición de una mayor cantidad de ADNlc en la sangre de individuos afectados con diferentes dolencias (Van der Vaart y Pretorius 2008).

Teniendo en cuenta que el registro del Ministerio de la Protección Social de Colombia (2007) sobre la enfermedad profesional en el período 2003-2005, sólo reporta un caso de intoxicación por disolventes no derivados del petróleo en la categoría de patologías derivadas de la exposición a sustancias químicas y que en Colombia existe una

población sometida a exposición ocupacional a solventes, como los pintores de carros, es necesario implementar una metodología que permita identificar en forma temprana los cambios biológicos, bioquímicos o morfológicos relacionados con los efectos primarios de estos agentes genotóxicos.

En este orden de ideas, uno de nuestros objetivos consistió en determinar la cantidad de ADNlc en suero aislado a partir de la sangre periférica de los trabajadores expuestos.

### **3.4 Aberraciones cromosómicas**

La IARC (2010) incluyó a los hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, xileno, trimetilbenceno) utilizados como solventes y removedores de pinturas, en la lista de principales sustancias a las que los trabajadores pueden estar expuestos en la industria de la pintura. El benceno -clasificado desde 1987 dentro del grupo 1 como agente cancerígeno para los seres humanos- no solo es uno de los más usados, sino que presumiblemente tiene los niveles de exposición más altos. En 1897, Santesson describió por primera vez nueve casos de hemotoxicidad crónica a causa del benceno.

Este mismo efecto fue posteriormente documentado por Selling (1916). El primer caso de leucemia asociada con exposición al benceno fue descrito por Delore y Borgomano en 1928. Desde entonces, muchos casos de leucemia han sido relacionados con la exposición al benceno (Smith *et al* 2004). Por otra parte, la identificación de cambios cromosómicos en pacientes con leucemia no fue posible sino hasta después de que Ford y Hamerton (1956) hicieron el primer cariotipo de células somáticas normales, mientras que la primera evidencia de aberraciones cromosómicas (CA) no aleatorias en casos de leucemia fue reportada por Nowell y Hungerford en 1960.

De otro lado, un estudio de monitoreo efectuado para determinar el riesgo de exposición ocupacional de pintores de exteriores, determinó que estas personas presentaban mayor número de CA e intercambio de cromátides hermanas (SCE) y mayor frecuencia de micronúcleos en células sanguíneas y bucales, indicando que el daño citogenético observado podía estar asociado con el tiempo de exposición laboral (Pinto *et al* 2000, JI *et al* 2010). A partir de estos hechos, el estudio del daño en los cromosomas causado por la exposición al benceno ha cobrado gran importancia.

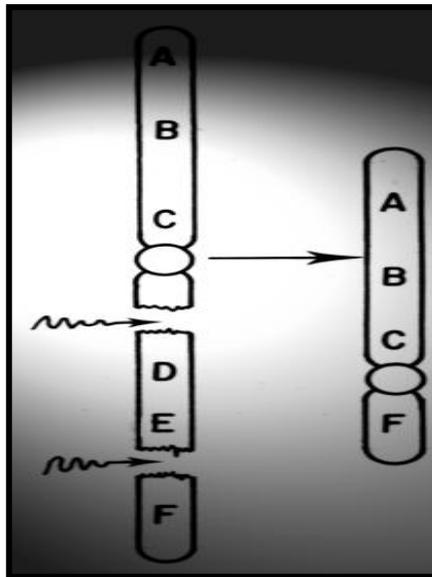
### 3.4.1 Aberraciones cromosómicas estructurales

Este tipo de anomalías afecta a la estructura del cromosoma en cuanto a la ordenación lineal de los genes. Aquí se incluyen deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Las anomalías estructurales implican cambios en la estructura de uno o varios cromosomas, de modo que la re-estructuración implica una ganancia o una pérdida de genes, lo que supone una patología para el portador o *anomalía desequilibrada*. Si no hay ganancia ni pérdida de genes, los portadores son normales, de manera que la anomalía es *equilibrada*.

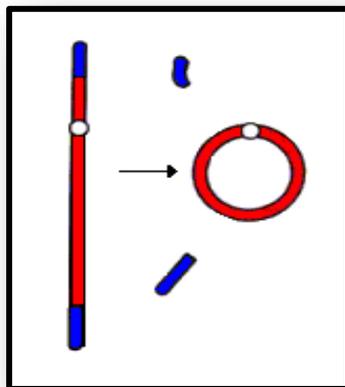
Las anomalías estructurales comprenden:

- **Deleciones:** Este tipo de anomalía involucra la pérdida de un fragmento de ADN de un solo cromosoma, lo que produce una anomalía desequilibrada. Si la pérdida ocurre al final del brazo q (brazo largo), la deleción se denomina deleción final (Figura 3.1) y si se produce en la zona intermedia, se denomina deleción intersticial o intercalar. Otro tipo de deleción es la llamada cromosoma de anillo (Figura 3.2), que se produce cuando los dos brazos de un cromosoma se unen, como resultado de las roturas generadas en los extremos de los mismos. Son poco frecuentes, pero dan lugar a patologías importantes.

**Figura 3-1:** Deleción final. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008

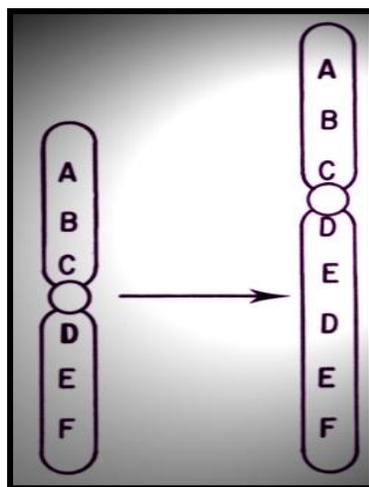


**Figura 3-2:** Cromosoma en anillo. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008



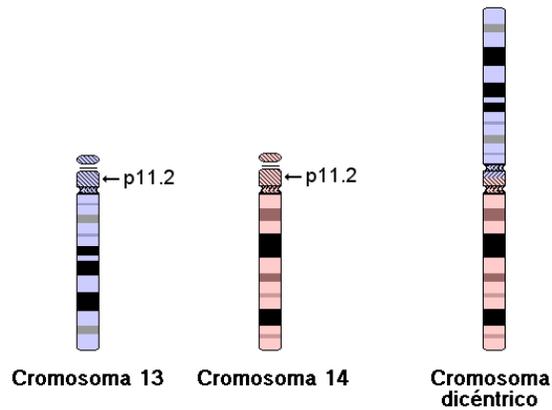
- **Duplicaciones:** Estas anomalías son opuestas a las deleciones y menos graves que éstas. Se caracterizan porque una región específica del cromosoma se encuentra repetida, debido a un error en la duplicación del ADN durante la meiosis (Figura 3.3), que consiste en que uno de los dos cromosomas homólogos no intercambia el fragmento correspondiente, conservando tanto su fragmento original como el fragmento de su par homólogo.

**Figura 3-3:** Duplicación. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008



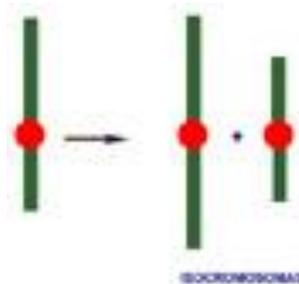
- **Cromosoma dicéntrico:** Como puede observarse en la Figura 3.4., este tipo de anomalía consiste en un cromosoma con dos centrómeros, que se origina a partir de la rotura de dos cromosomas, seguida de la fusión de los fragmentos que contenían el centrómero.

**Figura 3-4:** Cromosoma dicéntrico. Tomado de: Cytogenetics Information Site. Dave McDonald. Estados Unidos, 2008



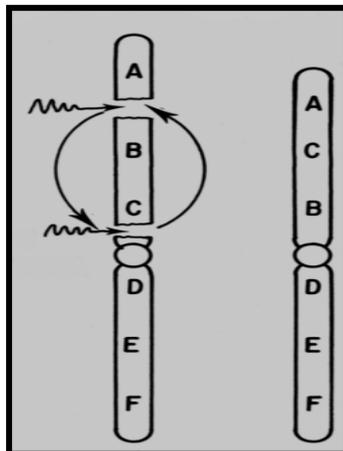
- **Isocromosoma:** En este tipo de anomalía, el cromosoma no se divide en forma longitudinal sino transversal, de modo que no se separan las cromátides sino solo los brazos. Esto hace que el brazo corto sea igual al brazo largo y da origen, tanto a falta como a exceso de cromosomas en forma simultánea (Figura 3.5). Esta anomalía es usual en los cromosomas sexuales.

**Figura 3-5:** Isocromosoma. Tomado de: Monografía: Cromosomas y enfermedades. Anomalías cromosómicas. En línea, 2004



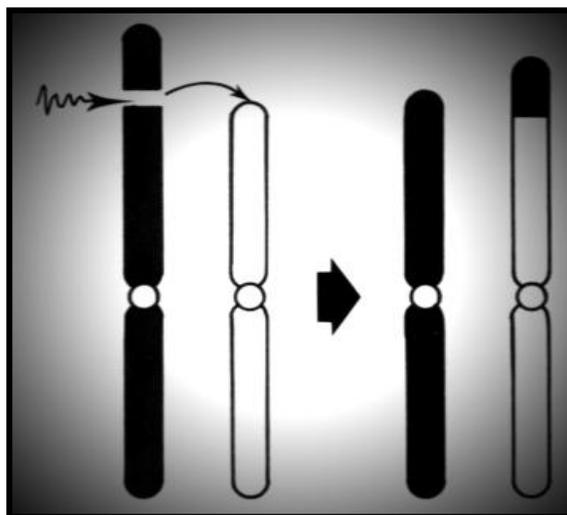
- **Inversiones:** Es una anomalía que se presenta cuando ocurren dos cortes dentro de un mismo cromosoma y el segmento intermedio gira  $180^\circ$  (se invierte) y se vuelve a unir, formando un cromosoma que estructuralmente tiene la secuencia cambiada. Normalmente no hay riesgo de patologías para el individuo, porque no hay pérdida ni ganancia de genes. Aunque el portador de una inversión puede ser completamente normal, tiene un riesgo ligeramente mayor de producir un embrión con un desequilibrio cromosómico, debido a que un cromosoma invertido tiene dificultad en emparejarse con su homólogo normal durante la meiosis. Existen dos tipos de inversiones:
  - *Inversión paracéntrica:* Se manifiesta cuando el segmento cromosómico afectado en el mismo brazo no incluye al centrómero.
  - *Inversión pericéntrica:* Cuando el fragmento cromosómico afectado incluye al centrómero. Esto significa que se producen dos roturas, cada una en un brazo del cromosoma (Figura 3.5). (Forero, en línea).

**Figura 3-6:** Inversión pericéntrica. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008



- **Translocaciones:** Estas involucran el intercambio de material entre dos o más cromosomas diferentes que se han roto previamente. Una translocación es recíproca o equilibrada cuando se realiza con fragmentos que incluyen a los telómeros (Figura 3.7). Por tanto, no hay pérdida ni ganancia de genes, lo que hace que el riesgo de problemas para el individuo sea nulo si es familiar y ligeramente mayor si es *de novo*. Es posible que surjan problemas con las translocaciones, cuando a partir de un progenitor equilibrado se originan gametos que no contienen ambos productos de la translocación. Cuando tal gameto se combina con un gameto normal del otro progenitor, el resultado es un embrión desequilibrado, parcialmente monosómico para un cromosoma y parcialmente trisómico para el otro. Cuando la translocación se realiza con fragmentos de cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22), las translocaciones son de tipo **robertsoniano**. Si ocurre en el brazo p, el portador tiene 45 cromosomas y presenta una anomalía tanto estructural como numérica, pero es completamente normal. Si por el contrario, se pierden los brazos q de los cromosomas acrocéntricos, las monosomías y trisomías son letales (Navarro, en línea). Vale la pena tener en cuenta el reporte del hallazgo de translocaciones  $t(3;21)(q26;22)$  en la médula ósea de un pintor de 64 años de edad, quien fue diagnosticado con anemia refractaria y cuyo historial incluía exposición a solventes orgánicos, como el benceno (Tasaka *et al* 1992).

**Figura 3-7:** Translocación recíproca. Tomado de: Anomalías cromosómicas. Úrsula Muñoz. España, 2008



### 3.4.2 Aberraciones cromosómicas numéricas

Este tipo de anomalías ocurren cuando el número de cromosomas está alterado, bien sea con un mayor o con un menor número, lo que provoca la aparición de defectos congénitos. Incluyen las poliploidías (triploidía:  $3n$ , tetraploidía:  $4n$ ) y diversos tipos de aneuploidías (trisomías:  $2n+1$ ; monosomías:  $2n-1$ ). Las anomalías numéricas pueden afectar tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales. Generalmente, la pérdida de cromosomas tiene una mayor repercusión que la ganancia sobre sus portadores.

Los individuos triploides ( $3n$ ) presentan una copia extra de todos los cromosomas (69 en total). Estas personas pueden ocasionalmente sobrevivir hasta el nacimiento, pero usualmente mueren durante el periodo neonatal (Navarro, en línea).

- **Las tetraploidías ( $4n$ )** son muy raras y se caracterizan porque los individuos afectados tienen 92 cromosomas en total, con cuatro copias de cada cromosoma.

En cuanto a las aneuploidías, la dotación cromosómica solo difiere en uno o pocos cromosomas extras o ausentes.

Las células que han perdido un cromosoma presentan **monosomía** para ese cromosoma, mientras que aquellas con un cromosoma extra muestran **trisomía** para el cromosoma implicado. Casi todas las monosomías autosómicas llevan a la muerte poco después de la concepción y sólo unas pocas trisomías permiten llegar al nacimiento. La anomalía autosómica numérica más común es el Síndrome Down o trisomía 21.

Las anomalías numéricas se pueden presentar por dos razones:

- Retraso en la meiosis de un cromosoma, que conduce a su pérdida en la anafase.
  - No disyunción meiótica (no segregación normal) de los cromosomas homólogos o las cromátidas hacia los polos opuestos.
- **Mosaicismo o mixoploidías:** En este tipo de anomalía coexisten en un individuo dos o más líneas celulares cromosómicas diferentes, de modo que puede haber células normales con líneas aneuploides, o solo líneas celulares anormales con aneuploidías y/o euploidias aberrantes. Los mosaicos

estructurales son muy poco frecuentes. El grado en el cual un individuo resulta afectado clínicamente depende habitualmente del porcentaje de células anormales (McDonald 2008).

Las anomalías numéricas y estructurales también se pueden clasificar en dos categorías principales: *constitutivas* -aquellas con las que se nace- y *adquiridas*, que surgen como consecuencia de otras enfermedades, como el cáncer.

Con relación a la exposición ocupacional a los solventes orgánicos contenidos en las pinturas y las anomalías cromosómicas, la ganancia de un cromosoma del grupo C (cromosomas 6 al 12 y X), trisomía C (+C) ha sido la aberración detectada con mayor frecuencia en los casos asociados con exposición a benceno (Formi y More 1967; Aksoy *et al* 1974; Sellyei y Kelemen 1971; Vigliani y Forni 1969). Por otro lado, se ha encontrado pérdida de cromosomas del grupo G, en la mayoría de células de un caso de leucemia mieloide aguda (AML) asociada con la exposición al benceno (Sellyei y Kelemen 1971).

También existen estudios que no reportan presencia de aberraciones cromosómicas en personas expuestas al benceno (Major *et al* 1994, Yardley-Jones *et al.*1990). Aunque no están claras las razones de estos hallazgos negativos, existen factores que pueden modificar los resultados, por ejemplo, que haya un pequeño número de sujetos de estudio o de células evaluadas por individuo. Otras razones pueden deberse a una exposición aguda al benceno en corto plazo, a bajos niveles de exposición al benceno o baja exposición combinada con tolueno u otros solventes, o también a diferencias étnicas entre el grupo control y los sujetos expuestos. A pesar de estos estudios ocasionales negativos, el peso total de la evidencia indica fuertemente que el benceno induce aberraciones cromosómicas (CA) en los linfocitos de sangre periférica de los trabajadores expuestos (Zhang *et al* 2002).

Con base en los estudios mencionados y con varios estudios prospectivos de cáncer que han mostrado una asociación entre las aberraciones cromosómicas en linfocitos de la sangre y el posterior riesgo de cáncer (Bonassi *et al* 1995), nos permitimos proponer una evaluación temprana del daño citogenético, mediante la determinación de varios marcadores como ADN libre circulante, dispersión del ADN y aberraciones cromosómicas, con la finalidad de establecer el riesgo relativo de enfermedades como el cáncer, entre los trabajadores de la industria de la pintura ocupacionalmente expuestos a diversos solventes.

## 4. Metodología

### 4.1 Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio piloto o investigación preliminar, en el que se estudiaron dos grupos de individuos: uno expuesto a solventes orgánicos presentes en pinturas de vehículos automotores y un grupo referente o no expuesto, constituido por individuos de edades similares, no expuestos a los solventes.

### 4.2 Tamaño de la muestra

Para un estudio piloto, no existe un tamaño de muestra mínimo, este no puede ser muy pequeño porque podría no ofrecer los resultados esperados, pero tampoco muy grande por cuestiones de costos y recursos económicos. Por esta razón, se tomó el siguiente tamaño de muestra no probabilística:

<b>Grupo expuesto</b>	<b>Grupo no expuesto</b>
Tamaño de la muestra: 33	Tamaño de la muestra: 33

### 4.3 Selección de los grupos de estudio

Debido a que muchos talleres de pintura de vehículos automotores de la ciudad de Bogotá laboran en el ámbito de la informalidad, no se cuenta con estadísticas confiables sobre este gremio. Según documentos de la Alcaldía de Bogotá, se ha determinado que en la localidad Barrios Unidos funciona una gran cantidad de talleres automotores concentrados en tres sectores preferenciales: 7 de agosto, Rionegro y Alcázares. Se seleccionaron cierto número de talleres, en los cuales se pudo recolectar el tamaño de muestra requerido (33 personas), se identificaron a las personas expuestas en forma rutinaria a los solventes de las pinturas y, este número, conformó el grupo expuesto. Se seleccionaron al azar en el sector del 7 de agosto partiendo, en primer lugar, del principio de voluntariedad de participación en el estudio tanto del dueño o del administrador del taller como del propio individuo expuesto y, en segundo lugar, de la información aportada en un

cuestionario que incluyó aspectos personales, familiares, alimentarios, de salud y relacionadas con el ambiente de trabajo. Los individuos del grupo no expuesto, también 33, se escogieron teniendo en cuenta que tuvieran un rango de edad similar al grupo expuesto, con una desviación de +/- dos (2) años de edad, que no hubieran estado expuesto a solventes orgánicos y sin ningún vínculo o cercanía con los lugares donde se aplican pinturas.

El consentimiento informado diseñado advirtió a los participantes acerca de los posibles riesgos en el proceso de la toma de muestras de sangre y contenía la información más relevante del estudio, como importancia e impacto social y el destino de las muestras biológicas recolectadas. El consentimiento fue firmado por las personas que aceptaron tomar parte en el estudio (expuestos como no expuestos).

## **4.4 Criterios de inclusión y exclusión**

Fueron incluidos en el grupo expuesto hombres, entre 18 y 75 años de edad y tiempo de trabajo o exposición a solventes orgánicos mínimo de tres meses. Fueron excluidos del estudio quienes hubiesen padecido de hepatitis o cáncer o hubieran estado sometidos a tratamiento médico prolongado reciente. El grupo control se seleccionó bajo los mismos criterios que el grupo expuesto, con la excepción de que estas personas no debían haber estado expuestas a solventes orgánicos.

## **4.5 Evaluación de daño genotóxico**

### **4.5.1 Obtención de las muestras de sangre**

Las muestras de sangre periférica, fueron tomadas en horas de la mañana, bajo condiciones de asepsia, después de que el participante del estudio firmó el consentimiento informado. Se obtuvieron tres muestras de 5 mL de sangre periférica: Una destinada para el aislamiento de linfocitos (ensayo cometa), otra para el ensayo de ADN libre y una más para la determinación de aberraciones cromosómicas. Las muestras se depositaron en tubos vacutainer con heparina o con EDTA o con gel separador de suero y se procesaron en el transcurso de las siguientes 48 horas.

### **4.5.2 Aislamiento de linfocitos**

A partir de la muestra de sangre recolectada en tubo vacutainer con heparina, se tomó un volumen de 5 mL de sangre y se procedió a realizar el aislamiento de linfocitos mediante un gradiente de densidad utilizando histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) y centrifugación a 2000 rpm durante 30 minutos. La capa intermedia de linfocitos se recuperó, se lavó con PBS y luego se centrifugó a 1250 rpm por 15 minutos. Este paso se repitió cuatro veces

más. El *pellet* o botón con linfocitos se homogenizó y se llevó a un volumen de 1 mL, mediante la adición de PBS.

### 4.5.3 Prueba de citotoxicidad por exclusión con azul de trypan

Para la correcta interpretación de los datos del ensayo cometa, debe primero establecerse que el daño a evaluar sea producto de genotoxicidad y no de citotoxicidad (Fenech *et al* 1999). Con este propósito, se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión de trabajo y se mezclaron con 90  $\mu$ L de solución de azul de trypan al 0.4%. 40  $\mu$ L de esta solución se llevaron a la cámara de conteo celular de *neubauer*. La relación entre el número de linfocitos vivos y muertos permitió conocer el porcentaje de viabilidad celular. Se considerará como aceptable un porcentaje de 85-95% (Pitarque 1999). De acuerdo al número de células vivas, se determinó el volumen de suspensión celular para utilizar en el ensayo, el cual contenía  $4 \times 10^3$  linfocitos.

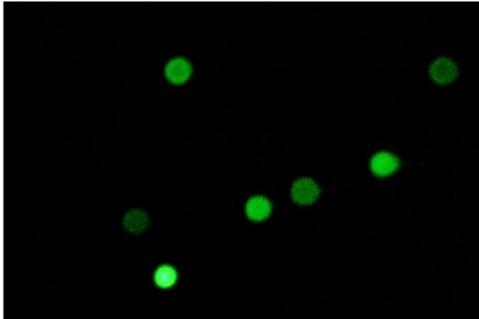
### 4.5.4 Ensayo Cometa

- *Lisis, desenrollamiento del ADN y electroforesis:* El volumen de suspensión celular en microlitros que contenía  $4 \times 10^3$  células se mezcló con agarosa LMA al 0.5%, para completar una solución que posteriormente se depositó sobre placas *Trevigen Comet Assay Kit*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las placas se dejaron inmersas en solución de lisis (*Trevigen Comet Assay Kit - Lysis solution*) por una hora, luego se lavaron con PBS para remover sales y detergentes y se depositaron en la cámara de electroforesis, a 4°C, con buffer alcalino (10N NaOH, 200 mM EDTA, pH 13) durante 25 minutos. Pasado este tiempo, se corrió la electroforesis por 30 minutos a 300 mA y 25 voltios. Una vez retiradas de la cámara, las placas se lavaron con buffer neutralizante (0.4 M Tris, pH 7.5) y se tiñeron con *SYBR Green*, según las instrucciones del kit *Trevigen*. Las preparaciones se observaron al microscopio de fluorescencia, con una magnificación de 10x.

Para el registro de datos se analizaron fotografías de los cometas y se registraron aquellos con morfología aceptable: cabeza bien definida y separado de los otros cometas, y se descartaron las células fantasma o apoptóticas, con cabeza no definida. El conteo se efectuó en la parte central de la preparación. Para el estudio de las imágenes de los cometas se utilizó el programa editor *CometScore*, que las analiza con base en la medida de la fluorescencia y la migración del ADN y arroja como resultado la información

sobre momento, momento olive y longitud de la cola y porcentaje de ADN en la cola, en una tabla que puede ser importada a formato Excel para el análisis estadístico correspondiente. Posteriormente, se clasificaron los cometas de acuerdo con su morfología, en categorías de daño que van desde 0 (sin daño), hasta 4 (daño máximo) para los dos grupos de estudio.

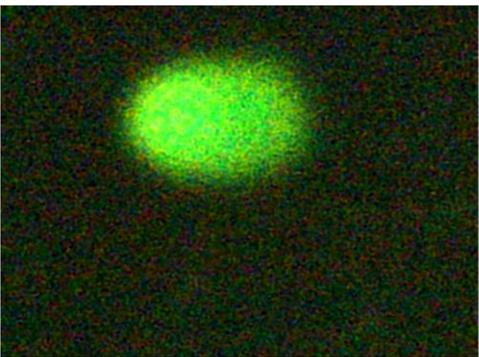
**Figura 4-1:** Clasificación visual de los tipos de cometas. Imágenes de cometas de linfocitos de los individuos que conforman el grupo de estudio, teñidos con SYBR-Green.



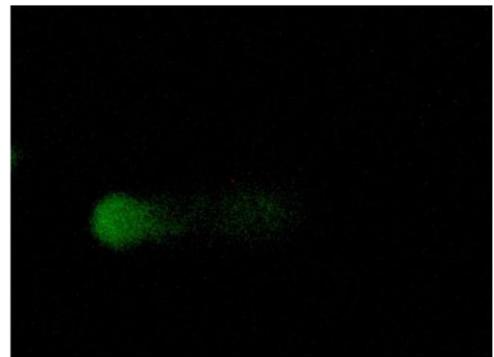
Cometa tipo 0



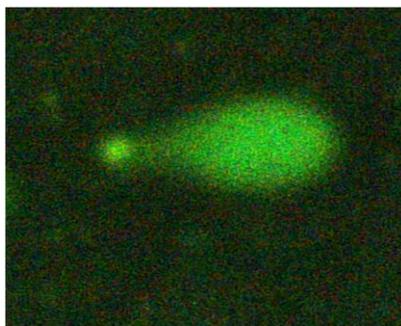
Cometa tipo 1



Cometa tipo 2



Cometa tipo 3



Cometa tipo 4

Las directrices internacionales para el ensayo cometa han avalado estas metodologías observador-dependientes, como altamente correlacionadas con los análisis de imágenes computacionales y las han validadas como parámetro de cuantificación de daño genético (Tice *et al* 2000, Collins 2004).

## **4.6 Evaluación de daño cromosómico mediante detección de aberraciones cromosómicas con bandas G**

### **4.6.1 Cultivo de sangre periférica**

*Procedimiento:* Se recolectó un volumen de 4-5 mL de sangre en tubo vacutainer con heparina y se mezcló por inversión. Se tomaron 300 µL de sangre, se depositaron en tubo falcon de 15 mL y se agregó 4 mL de medio de crecimiento PBMAx (Gibco), este medio es específico para cariotipos ya que contiene fitohemoaglutinina, sustancia capaz de inducir las células a mitosis. Se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas. Este procedimiento se efectuó por duplicado para cada grupo.

### **4.6.2 Cariotipo**

Una vez retirados los tubos falcon de la incubadora, se les adicionó un volumen de 100 µL de colchicina (fármaco antimitótico que detiene la división celular en metafase o la inhibe) y se llevaron de nuevo a incubación a 37°C por 20 minutos, después de lo cual se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se agregaron 6 ml de solución hipotónica (KCl) y se homogenizó el botón celular. Enseguida se llevaron a la incubadora por 20 minutos, luego se adicionaron 2 mL de solución fijadora (metanol-ácido acético 3:1) y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión y se procedió a realizar una centrifugación a 2500 rpm por diez minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 6 mL de solución fijadora, nuevamente se homogenizó el botón celular y se incubó a -20°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por diez minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 mL de fijador. Se efectuó homogeneización y se centrifugó a 2500 rpm por diez minutos. Este último paso se repitió dos veces más. Enseguida se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de fijador y en ese volumen se resuspendió el material celular.

Para llevar a cabo el extendido del material celular, se depositaron de tres a cuatro gotas de la solución en lámina portaobjetos y se colocó encima un cubreobjetos y se hizo presión para dispersar los cromosomas. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las muestras trabajadas.

Por cada lámina extendida, fueron analizadas al microscopio de luz (10X) como mínimo 25 células en metafase, que estuvieran bien separadas unas de otras con el fin de que fuera posible apreciar la coloración de las bandas G.

#### **4.6.3 Bando G con colorante Giemsa**

Una vez realizado el extendido celular en las láminas, éstas se envejecieron al horno a 80°C por dos horas y posteriormente se sumergieron durante 30 minutos en una solución salina de citrato sódico 2X a 65°C. Después fueron lavadas con agua destilada y se dejaron secar al aire. A continuación, se introdujeron en una solución de tripsina 0.25% y agua destilada (1:1) previamente enfriada a 2°C, inicialmente por cinco segundos. Se enjuagaron las láminas con abundante agua de chorro y se procedió a realizar la tinción de cada lámina, depositando 4 mL de solución de bandas G (colorante Giemsa, tampón Sörensen y agua destilada en proporción 1:1:23 respectivamente), durante 10 minutos. El tampón Sörensen es una mezcla de solución A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.08 g/L) y solución B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  12.88 g/L) en proporción de volumen 1:1 y ajustada a pH 6.8. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua y se dejaron secar. Se montó cada lámina en el microscopio convencional y se observó el bando a un aumento de 100X. Si el patrón de bandas era aún oscuro, se procedió a repetir el procedimiento con la tripsina, hasta obtener el bando claro-oscuro característico de las bandas G.

Enseguida se realizó el conteo de las metafases a 10X, de mínimo 25 metafases por cada individuo, tanto expuesto como no expuesto. Tras el análisis al microscopio a 100X, se tomaron imágenes de aquellas células en metafase que presentaban la mejor calidad, mediante la utilización de una cámara marca Nikon. Los cromosomas fueron organizados en pares, de acuerdo con su tamaño y su patrón de bandas, para formar un cariotipo, lo que permitió determinar la presencia de anomalías numéricas y estructurales. En caso de encontrar dos anomalías numéricas en las 25 metafases analizadas, se debió ampliar el conteo a 50 metafases, con el fin de verificar la anomalía encontrada. En caso de encontrar dos anomalías estructurales, el conteo se debió ampliar a 100 metafases, para su confirmación. Este procedimiento se rige por el ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature).

### **4.7 Ensayo de cuantificación de ADN libre por fluorescencia**

El ADN libre celular circulante (ADNlc) se determinó directamente a partir del suero obtenido de la muestra de sangre recolectada en tubo de separación de suero, siguiendo el protocolo propuesto por Goldstein *et al* (2009).

En primer lugar, los sueros fueron centrifugados dos veces, a 2000 rpm por diez minutos, recolectando y llevando a un nuevo tubo el sobrenadante obtenido en cada paso. Enseguida se efectuó ultra-centrifugación a 14000g por diez minutos, con el fin de separar completamente el suero de las células nucleadas más próximas.

Se preparó el fluorocromo *SYBR-Gold* Nucleic acid gel stain (Invitrogen) y se hizo una primera dilución 1:1000 en dimetilsulfóxido (DMSO), seguida de una segunda dilución 1:8 en PBS. Esta solución se guardó en la oscuridad. Por otra parte, se prepararon siete diluciones seriadas de estándar de ADN de esperma de salmón (Sigma-Aldrich) comenzando desde 0 ng/mL hasta 33000 ng/mL, diluido en agua estéril. Enseguida se tomó una placa de 96 pozos y en cada pozo se vertió por triplicado un volumen de 40  $\mu$ L de la muestra de suero o 40  $\mu$ L de las soluciones estándar de ADN de esperma de salmón, junto con 160  $\mu$ L de la solución *SYBR-Gold* previamente diluida (dilución final del *SYBR-Gold* 1:10000). Se homogenizó muy bien la placa teniendo cuidado de no generar burbujas y se procedió llevar a cabo la determinación de la fluorescencia de cada una de las muestras en el espectrofluorómetro Tecan, Durham, NC, USA., mediante el uso del software Magellan versión 7.0, teniendo en cuenta las condiciones requeridas para el uso del *SYBR-Gold*, longitud de excitación a 485 nm y la longitud de emisión a 535 nm. Una vez realizada la lectura de la placa, los datos fueron exportados a un libro de Excel y procesados para su respectivo análisis estadístico.

Las concentraciones de ADNlc presente en las muestras de suero fueron calculadas a partir de la interpolación de la curva de los estándares de ADN de acuerdo con un modelo de regresión lineal. Para confirmar la especificidad del ensayo, se preparó un control negativo, mediante la selección de seis muestras aleatorias de los sueros recolectados, a los que se les realizó una digestión enzimática con *ADNasa I* Amplification Grade (Invitrogen Corporation, Brazil- 500 U/mL) y buffer de reacción 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, KCl 500 mM), incubándolas a 37°C por cinco horas, con el fin de eliminar la posible presencia de ADN contenido en el suero. Después del tratamiento, se aplicó 1  $\mu$ L de EDTA 2,5 mM y se incubó a 65°C durante 15 minutos. De otro lado, con el fin de confirmar que la fluorescencia fuera debida solo a ADN y no a ARN, se tomaron muestras aleatorias de los sueros recolectados, a los que se les realizó una digestión enzimática con *RNase-free DNase* (Promega, 1500 U/mL), incubándolas a 37°C por cinco horas.

Tanto la obtención de las muestras de sangre, como el aislamiento de los linfocitos, la prueba de exclusión, el ensayo cometa, la cuantificación de ADN libre y el análisis de cariotipos para detección de aberraciones cromosómicas, se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario y fueron coordinadas por el grupo de Ciencias Básicas Médicas de la misma universidad.

## 5. Análisis estadístico

Con el fin de analizar los resultados obtenidos, se utilizaron variables cuantitativas y cualitativas. Para describir las variables cualitativas (cariotipos), se realizó un análisis descriptivo por conteos de frecuencias absolutas y relativas. En cuanto a las variables cuantitativas (ADN libre: variable continua y cometa: variable discreta), se emplearon las medidas de tendencia central (promedio y mediana) y de variabilidad (rango y desviación estándar).

Previamente, para todas las variables, se evaluó la homogeneidad de varianza con ayuda de la prueba *Shapiro-Wilk* y la normalidad con la prueba *Kolmogorov-Smirnov*

Para la variable asociada con la determinación de aberraciones cromosómicas, tanto en el grupo expuesto como en el no expuesto, se calcularon las frecuencias absolutas y relativas (expresadas como porcentaje) y se evaluó la homogeneidad de varianza con ayuda de la prueba *Shapiro-Wilk* y la normalidad con la prueba *Kolmogorov-Smirnov*. La prueba no paramétrica exacta *Wilcoxon* se aplicó en caso de que no se cumplieran los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza. Todos los datos obtenidos fueron analizados con el programa SPSS (*Statistical Package to Social Scientific*). El nivel de significancia máximo para cada prueba fue 0.05.

### 5.1 Hipótesis nula

- No existen diferencias en los valores obtenidos en los ensayos de evaluación de daño del ADN (cometa, ADN libre y cariotipos), en individuos ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos y en individuos no expuestos a dichos solventes.

## 5.2 Hipótesis alterna

- Los individuos ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos presentan valores mayores para los ensayos indicados para medir el daño en el ADN (cometa, ADN libre y cariotipos), que los individuos no expuestos.
- Existe correlación entre el tiempo de exposición ocupacional a los solventes orgánicos y el aumento en el daño en el ADN de los individuos expuestos.

## 5.3 Variables

- Variable dependiente: Daño en el ADN
- Variables independientes: Exposición/no-exposición a solventes orgánicos  
Tiempo de exposición a solventes orgánicos.

## 6. Resultados

### 6.1 Caracterización del grupo de estudio

En el estudio piloto, se utilizó un cuestionario que permitió indagar acerca de aspectos laborales como el tiempo de exposición a los solventes orgánicos y hábitos personales, como el fumar o ingerir bebidas alcohólicas.

Los individuos del grupo expuesto y los del grupo no expuesto fueron emparejados por rangos etáreos, con una diferencia límite de edad de +/- dos años y con condiciones socioeconómicas similares (Ver Tabla 6-1 y Tabla 6-2).

**Tabla 6-1:** Caracterización del grupo expuesto y el grupo no expuesto

Grupo expuesto			Grupo no expuesto		Medidas de dispersión	
Código	Tiempo exposición (meses)	Edad	Código	Edad	Media	Desviación estándar
1	132	43	1	42	42,5	0,71
2	96	34	2	36	35,0	1,41
3	13	21	3	20	20,5	0,71
4	37	31	4	31	31,0	0
5	120	39	5	37	38,0	1,41
6	193	50	6	49	49,5	0,71
7	264	53	7	51	52,0	1,41
8	168	33	8	35	34,0	1,41
9	424	58	9	59	58,5	0,71
10	324	57	10	55	56,0	1,41
11	74	26	11	25	25,5	0,71
12	86	24	12	24	24,0	0
13	228	51	13	52	51,5	0,71
14	190	44	14	44	44,0	0
15	264	47	15	47	47,0	0
16	240	34	16	35	34,5	0,71
17	204	60	17	58	59,0	1,41

18	420	61	18	61	61,0	0
19	540	73	19	72	72,5	0,71
20	264	45	20	45	45,0	0
21	212	50	21	49	49,5	0,71
22	132	35	22	34	34,5	0,71
23	144	31	23	32	31,5	0,71
24	384	55	24	57	56,0	1,41
25	384	53	25	51	52,0	1,41
26	360	53	26	55	54,0	1,41
27	384	57	27	59	58,0	1,41
28	504	67	28	69	68,0	1,41
29	120	28	29	30	29,0	1,41
30	72	62	30	61	61,5	0,71
31	348	54	31	56	55,0	1,41
32	360	73	32	73	73,0	0
33	48	22	33	20	21,0	1,41

**Tabla 6-2:** Hábitos personales de los grupos de estudio

PORCENTAJE GRUPO EXPUESTO				PORCENTAJE GRUPO NO EXPUESTO			
Consumo cigarrillo		Consumo alcohol		Consumo cigarrillo		Consumo alcohol	
Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
27,27%	72,72%	97%	3%	18,18%	81,81%	85%	15%

## 6.2 Ensayo cometa

### 6.2.1 Prueba de citotoxicidad por exclusión con *azul de trypan*

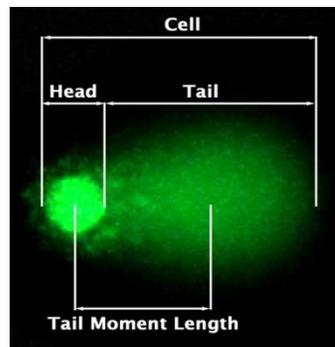
Esta prueba evaluó la viabilidad de los linfocitos de sangre periférica, mediante la discriminación entre células muertas y células vivas, según hayan incorporado o no el colorante. De acuerdo con la relación entre el número de linfocitos vivos y el de los muertos, se consideró el rango entre 85-95% como un porcentaje aceptable de viabilidad celular para la realización del ensayo.

### 6.2.2 Determinación del tipo de cometa

El agente empleado para la visualización de los cometas, fue el fluoróforo *SYBR Green*, el cual interactúa con el surco menor del ADN, emitiendo hasta 1000 veces más fluorescencia cuando está unido, que cuando está en solución libre.

Para determinar el tipo de cometa, se tomaron varias fotografías utilizando un microscopio de fluorescencia. Fueron contabilizados 50 cometas por pozo y dos pozos por muestra, para un total de 100 células por muestra, las cuales fueron posteriormente analizadas por medio del software *CometScore* (anexo A), que permite obtener los siguientes parámetros: Longitud del cometa, altura del cometa y área del cometa, diámetro de la cabeza, área de la cabeza, % ADN en la cabeza, longitud de la cola y área de la cola, % ADN en la cola y momento de cola (Figura 6-1).

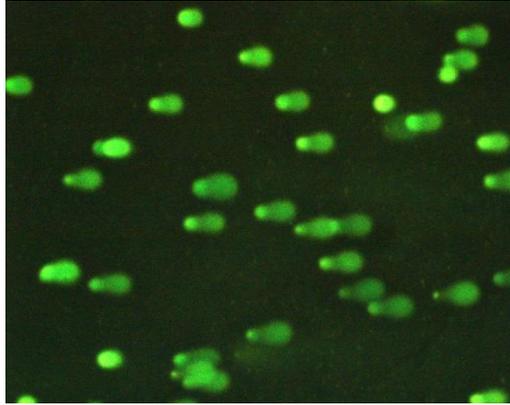
**Figura 6-1:** Imagen de los componentes de un cometa. Tomado de Singh *et al.* (1988)



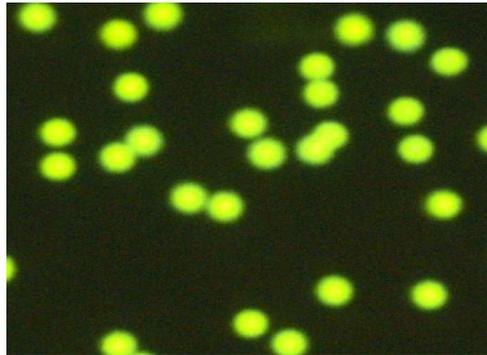
Como control positivo del ensayo, se utilizó el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , ( Ver Figura 6-2), el cual genera una morfología tipo cometa, al ser altamente oxidante e inducir en el ADN roturas de cadena doble, cadena simple y sitios alcali lábiles. Como control negativo se tomaron las células del grupo no expuesto, considerando que estos individuos no habían sido expuestos a los solventes orgánicos (Ver Figura 6-3). Finalmente, estos

controles fueron comparados con la morfología observada en el grupo expuesto a los solventes orgánicos (Ver Figura 6-4).

**Figura 6-2:** Cometas obtenidos de linfocitos tratados con  $H_2O_2$ . 10X



**Figura 6-3:** Cometas obtenidos de linfocitos de un individuo del grupo no expuesto. 10X



**Figura 6-4:** Cometas obtenidos de linfocitos de un individuo del grupo expuesto. 10X



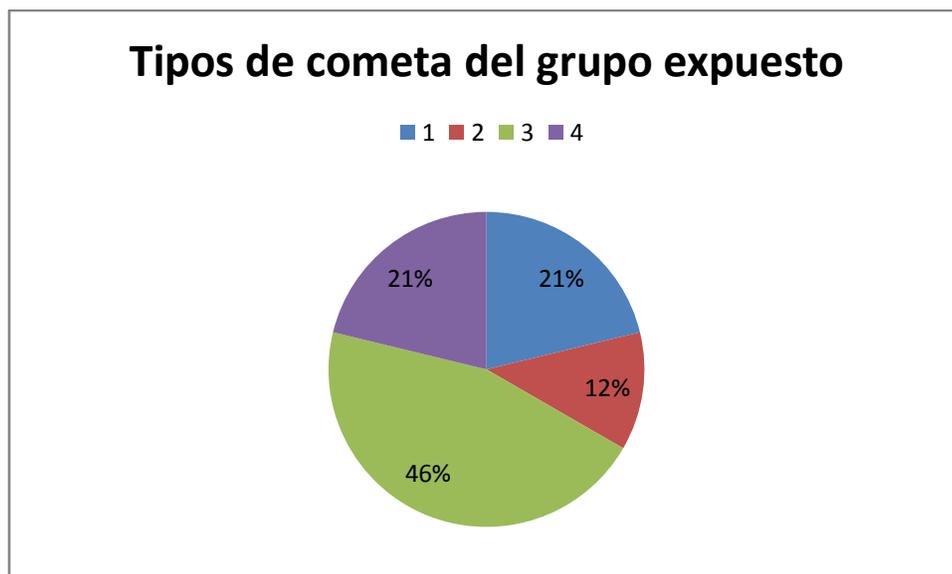
Teniendo en cuenta la intensidad de fluorescencia del *SYBR Green*, medida como la cantidad de luz emitida a 520 nm, después de la excitación a una longitud de onda de 480 nm, (Valsek M y Repa J, 2005), se establece que, la cantidad de *SYBR-Green* unido al ADN es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente.

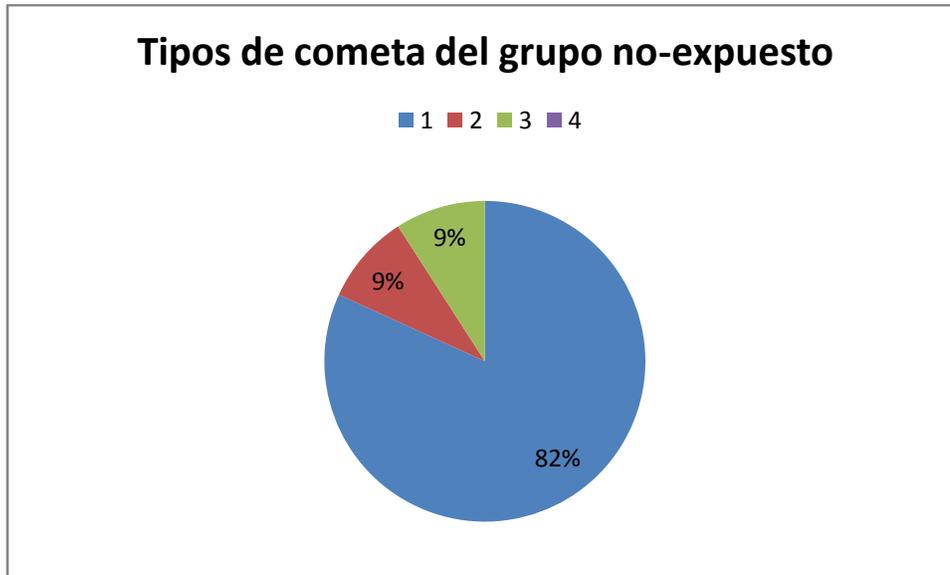
Como parámetro principal para determinar el tipo de cometa, se tuvo en cuenta la intensidad relativa de fluorescencia de la cabeza y de la cola (% ADN en la cola) (Collins *et al* 2004), como sigue:

- Cometa tipo 0: <5% ADN en la cola
- Cometa tipo 1: 6%-25% ADN en la cola
- Cometa tipo 2: 26%-50% ADN en la cola
- Cometa tipo 3: 51%-75% ADN en la cola
- Cometa tipo 4: >76% ADN en la cola

En el sistema de análisis de imágenes utilizado, cada punto o pixel de la imagen es la representación de un elemento sensible a la luz de la cámara y tiene un valor en una escala, que va desde 0 hasta 225 (escala de grises). En este orden de ideas, los datos obtenidos para cada uno de los parámetros antes mencionados son puntos de la imagen convertidos a números, que aunque están en unidades de pixeles, deben ser convertidos a micras. En este caso, el software permitió la definición de las regiones de interés del cometa (cabeza y cola), eliminando de esta forma el posible *background* o ruido de fondo que podría afectar la medición de la señal del cometa y permitiendo así la medición de la longitud del cometa. De acuerdo con el objetivo 10X empleado, el factor de conversión a micras fue 1.6, de modo que fue posible obtener los datos necesarios (Ver Anexo B y Anexo C) para establecer el tipo de cometa asociado con cada grupo evaluado (Ver Figuras 6-5 y 6-6).

**Figura 6-5:** Porcentaje de tipos de cometas del grupo expuesto



**Figura 6-6:** Porcentaje de tipos de cometa del grupo no expuesto

Mediante uso de la prueba no paramétrica *Wilcoxon*, se compararon los datos obtenidos en el ensayo cometa para los dos grupos evaluados. El 46% de los individuos expuestos mostraron cometas tipo 3 (moda) mientras que para el 82% de los no expuestos el más común fue el 1 (Tabla 6-3), lo que indica que hubo diferencias significativas entre estos valores ( $p < 0.001$ ), con un índice de confianza del 99%. Este resultado permite afirmar que la exposición ocupacional a solventes afecta la integridad del material genético.

**Tabla 6-3:** Estadísticos descriptivos del ensayo cometa para los dos grupos de estudio

Parámetros	Tipo de cometa expuesto	Tipo de cometa no expuesto
Media	2,67	1,27
Mediana	3,00	1,00
Moda	3,00	1,00
Desv. típ.	1,051	0,626
Rango	3	2
Mínimo	1	1
Máximo	4	3
Z	-4,466	

Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta (bilateral)	0,000
Sig. exacta (unilateral)	0,000
Probabilidad en el punto	0,000

## 6.3 ADN libre circulante por fluorescencia

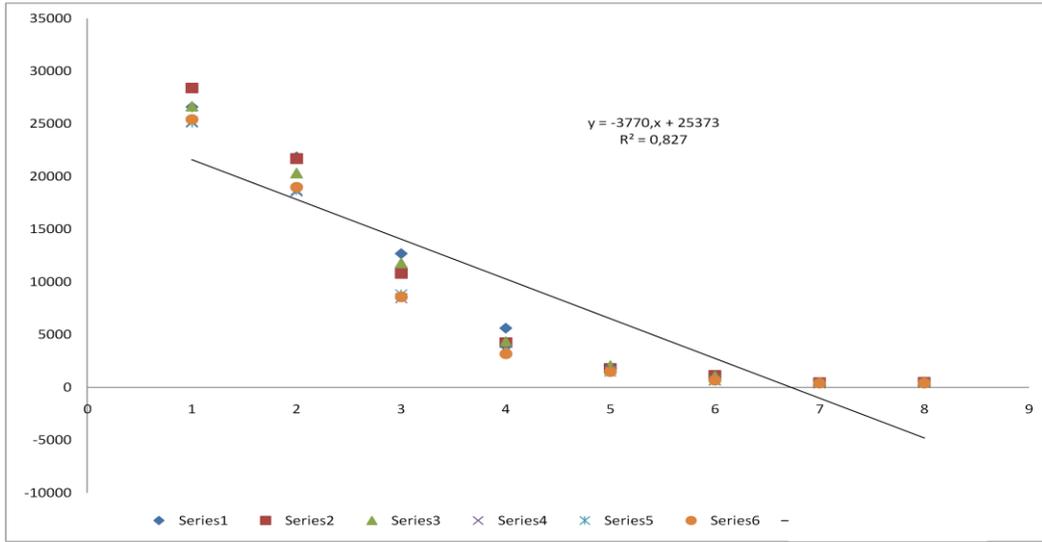
### 6.3.1 Curva estándar de calibración

La espectrofotometría de fluorescencia fue el método utilizado para cuantificar los niveles de ADN libre circulante en el suero. Debido a que las lecturas de fluorescencia miden en forma indirecta los niveles de ADN, requieren ser comparadas con una curva estándar. Esta curva fue elaborada de acuerdo con el protocolo sugerido por Douvdevani *et al* 2009 (Ver Figura 6-7). Considerando que el valor en la regresión fue  $R^2 = 0.827$ , se estableció que existe una asociación directa entre la disminución de la fluorescencia y la disminución de la concentración del ADN estándar.

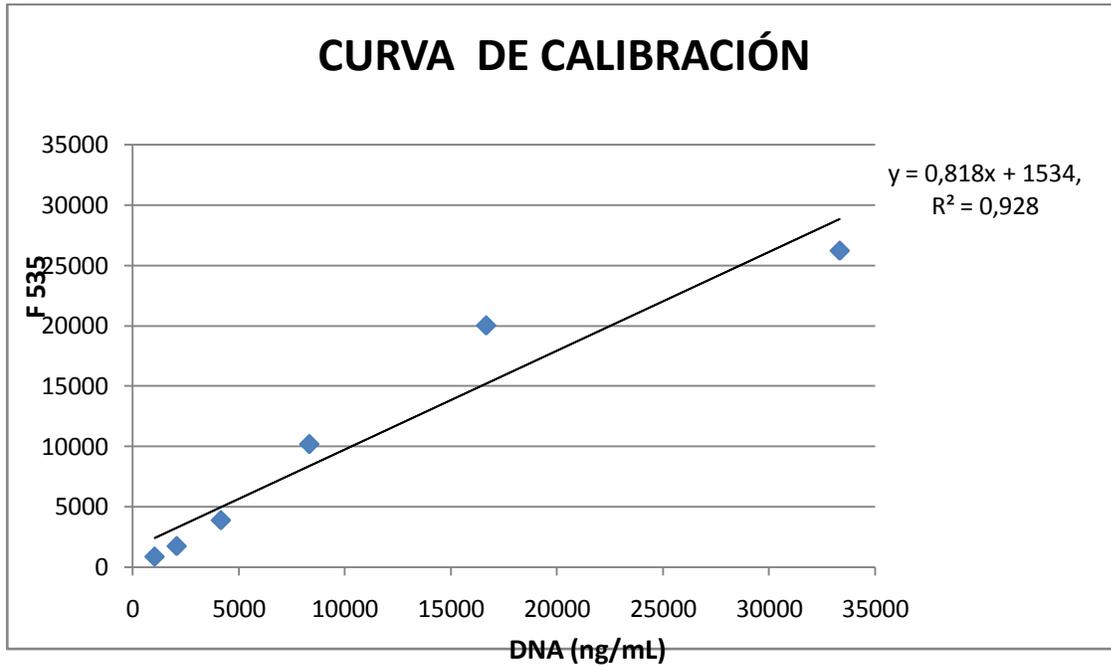
En adición, se elaboró una nueva curva de regresión lineal, que relacionaba los valores de fluorescencia con las concentraciones del ADN estándar de esperma de salmón y sus sucesivas diluciones (desde dos hasta cinco) (Ver Figura 6-8 y Tabla 6-4). En cada uno de los dos ensayos realizados, se elaboró una curva estándar de ADN de esperma de salmón y de cada dilución se obtuvieron lecturas por triplicado para cada muestra, ya fuera de los estándares respectivos o de las muestras de suero de los grupos evaluados. La ecuación de la recta fue  $Y = 0.818X + 1534$  y  $R^2 = 0.827$ .

Con esta ecuación se determinó la concentración de ADN libre en suero del grupo de expuestos y de no expuestos, a partir de la interpolación de los datos (Tabla 6-5 y Figura 6-9 y 6-10).

**Figura 6-7:** Valores de fluorescencia para las diluciones del estándar de ADN



**Figura 6-8:** Relación fluorescencia/concentración de ADN estándar



**Tabla 6-4:** Relación valores fluorescencia promedio y concentración de las diluciones seriales del estándar de ADN de esperma de salmón

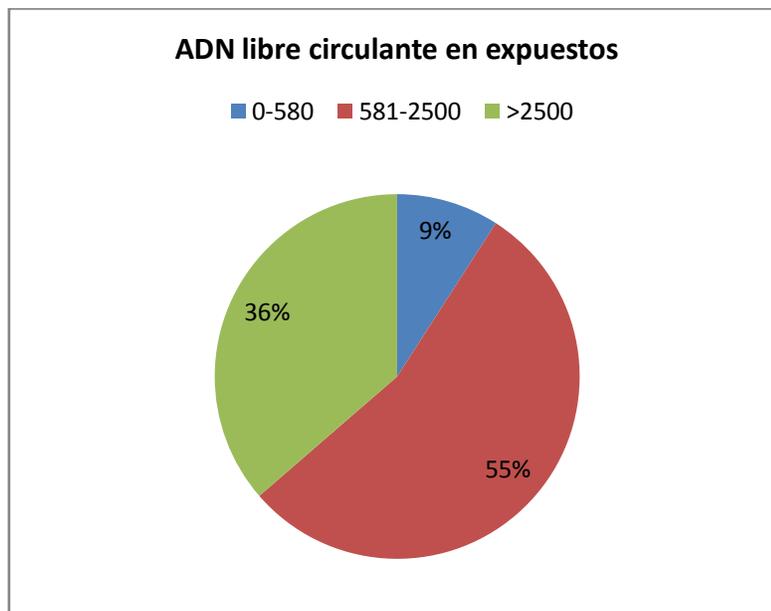
Estándar ADN	fluorescencia promedio	Concentración (ng/mL)
Solución patrón	26218	33330
Dilución 1	20022	16666
Dilución 2	10195	8333
Dilución 3	3890	4166
Dilución 4	1741	2083
Dilución 5	870	1041
SYBR-GREEN	453	
Blanco	420	

**Tabla 6-5:** Valores de ADN libre circulante en individuos expuestos y no expuestos

Grupo expuesto		Grupo no expuesto	
Caso	ADN Libre (ng/mL)	Caso	ADN Libre (ng/mL)
1	4758	1	13
2	1936	2	1018
3	1303	3	744
4	1364	4	3521
5	4717	5	3611
6	571	6	1213
7	4414	7	1306
8	2376	8	3957
9	4736	9	3926
10	4700	10	0
11	2225	11	1685
12	63	12	602
13	1865	13	416
14	2675	14	3805
15	1089	15	3625
16	5195	16	1136
17	1132	17	577
18	4830	18	0
19	1991	19	518
20	2298	20	0
21	3426	21	798
22	2709	22	1715

Grupo expuesto		Grupo no expuesto	
Caso	ADN Libre (ng/mL)	Caso	ADN Libre (ng/mL)
23	1045	23	610
24	2113	24	193
25	1567	25	801
26	2220	26	994
27	323	27	1805
28	4565	28	1394
29	1970	29	710
30	1038	30	0
31	1118	31	1140
32	1749	32	0
33	1083	33	1127

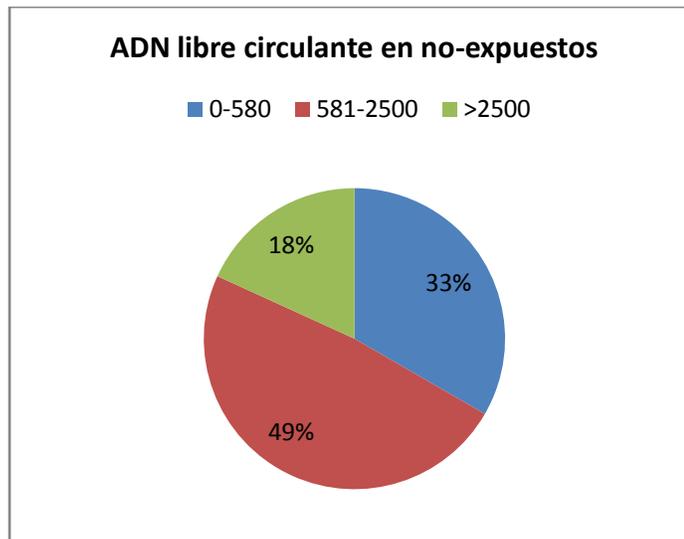
**Figura 6-9:** Niveles de ADN libre en suero del grupo expuesto



**Tabla 6-6:** Valores de referencia para el ADN libre circulante. Tomado de Douvdevani *et al* (2009)

Valor De Referencia ADN (ng/mL)	
Bajo	0-580
Elevado	581-2500
Alto	>2500

**Figura 6-10:** Niveles de ADN libre en suero del grupo no expuesto



Se realizó la prueba Shapiro-Wilk para evaluar si había distribución normal de los resultados de este ensayo. Como esto no ocurrió, se aplicó la prueba no-paramétrica *Wilcoxon* para comparar tanto las lecturas de fluorescencia de las muestras de suero, como los de ADN libre circulante, resultante de la interpolación de la curva de calibración de fluorescencia, para los dos grupos evaluados. La media de ADN libre circulante en el grupo expuesto fue 2439 ng/mL, con niveles bajos de ADNlc en el 9% de los individuos expuestos, mientras que en el grupo de los no expuestos, la media fue 1301 ng/mL, con un 33% de los individuos con niveles bajos de ADN libre circulante en suero (Ver Tabla 6-7).

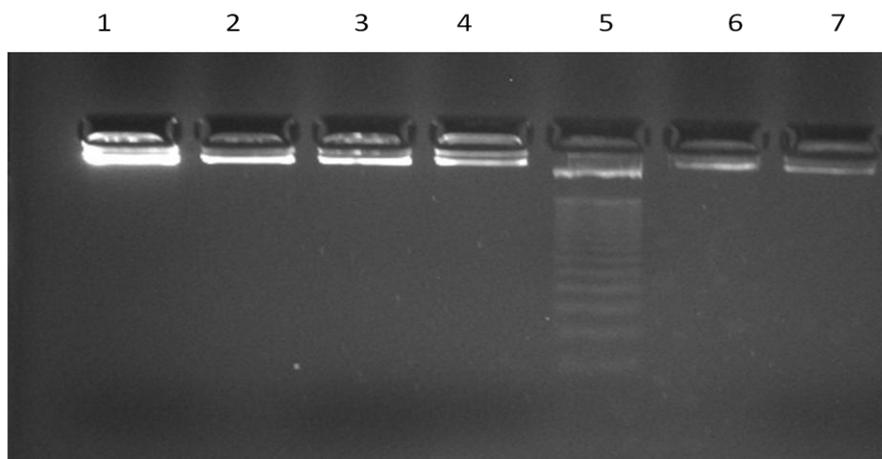
Fueron halladas diferencias significativas en el parámetro analizado, del orden del 0.001 ( $p < 0.01$ ), con un índice de confianza del 99%, lo que permite establecer que la exposición ocupacional a los solventes está asociada directamente con el aumento en los niveles de ADN libre circulante en el suero de individuos ocupacionalmente expuestos a dichas sustancias, en comparación con los no expuestos.

**Tabla 6-7:** Estadísticos descriptivos del ensayo ADN libre circulante para los dos grupos de estudio

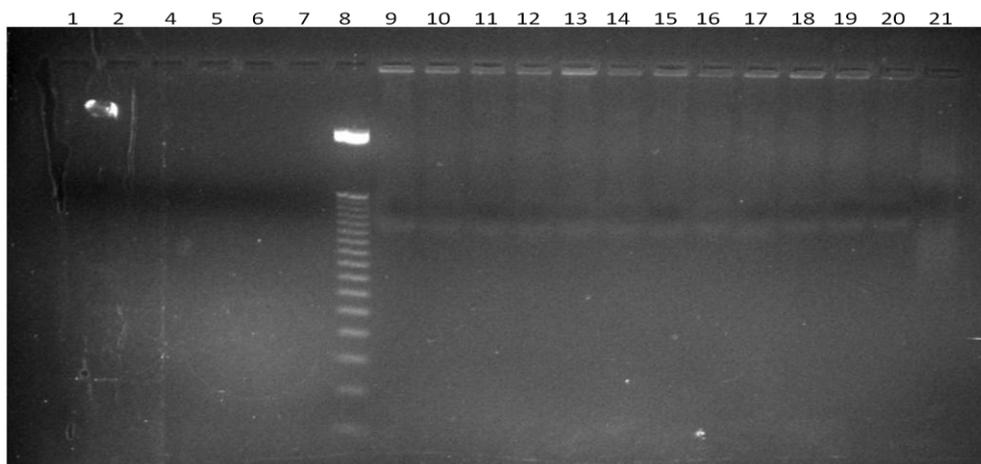
Grupo Expuesto			Grupo No Expuesto		
Media		2439,219629	Media		1301,81139
Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1902,690506	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	849,256167
	Límite superior	2975,748752		Límite superior	1754,36661
Media recortada al 5%		2420,444377	Media recortada al 5%		1227,29703
Mediana		2112,694377	Mediana		994,194377
Varianza		2289532,99	Varianza		1628933,93
Desv. típ.		1513,120283	Desv. típ.		1276,29696
Mínimo		63,1944	Mínimo		0
Máximo		5194,6944	Máximo		3957,0277
Rango		5131,5	Rango		3957,0277
		Fluorescencia no expuesto - Fluorescencia expuesto			ADN libre no expuesto - ADN libre expuesto
Z		-3,064			-3,029
Sig. asintót. (bilateral)		0,002			0,002
Sig. exacta (bilateral)		0,002			0,002
Sig. exacta (unilateral)		0,001			0,001
Probabilidad en el punto		0,000			0,000

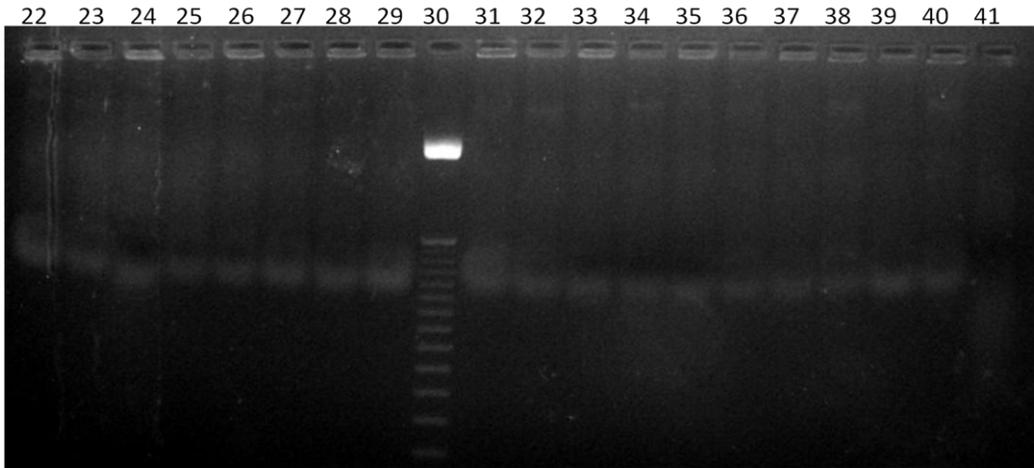
Con el fin de corroborar que las lecturas de fluorescencia fueran debidas exclusivamente a los niveles de ADN libre circulante en el suero extraído de la sangre, se realizaron dos electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, una para las diluciones seriadas que se realizaron a partir de una solución patrón de ADN de esperma de salmón (Figura 6-11) y otra para los sueros de los grupos evaluados (Figura 6-12).

**Figura 6-11:** Visualización de las diluciones seriales del estándar de ADN. Carril 1: Solución madre de ADN, carriles 2-4 y 6-7: Diluciones seriales del estándar de ADN (5:10), carril 5: Marcador de peso.

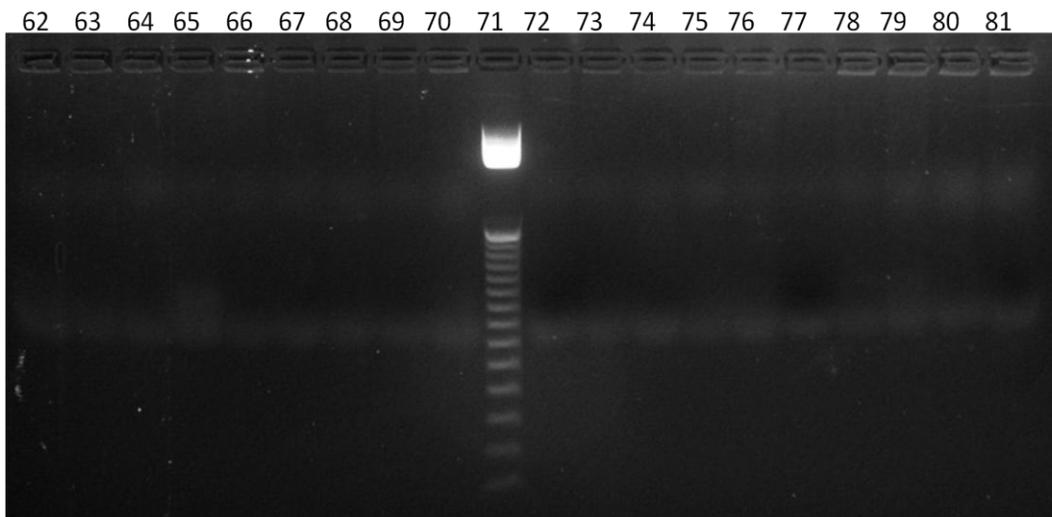
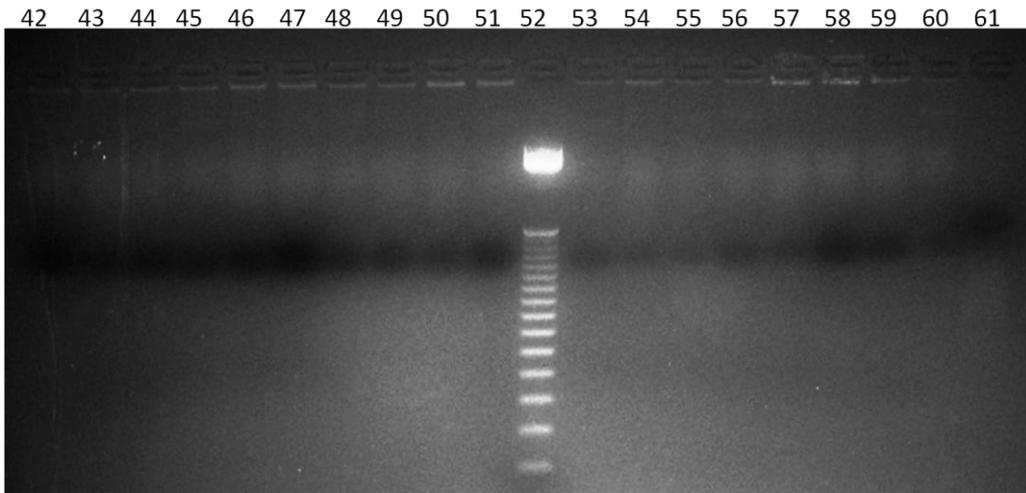


**Figura 6-12:** Visualización de los sueros. Carriles 1-7: Control negativo: Sueros tratados con DNasa-I, carriles 9-29 y 31-41 sueros del grupo expuesto (casos 1 al 32), carriles 8 y 30: Marcador de peso.





**Figura 6-13:** Visualización de los sueros. Carril 42: Suero expuesto caso 33. Carriles 43-51, 53-70 y 72-77: Sueros del grupo no expuesto (1-33). Carriles 52 y 71: Marcador de peso. Carriles 78-81 Control positivo: Sueros tratados con RNasa.



## 6.4 Evaluación del daño cromosómico mediante detección de aberraciones cromosómicas con bandas G

Fueron analizadas 522 metafases de 24 individuos expuestos y 286 metafases de 15 individuos del grupo no expuesto, para un total de 808 metafases.

En las tablas 6-8 y 6-9, se resumen los hallazgos encontrados en 24 individuos que hacen parte del grupo expuesto y en 15 del grupo no expuesto, tanto para las aberraciones numéricas como para las aberraciones estructurales, adicionalmente se incluyó la presencia de otro tipo de daño en los cromosomas como son las roturas y las fragilidades.

**Tabla 6-8:** Resumen complementos cromosómicos del Grupo expuesto

Grupo expuesto		
Código	Complemento cromosómico	Observaciones
1	46,XY [20]	fra(1)(q12),fra(3)(p12),chtb(1)(p11),fra(9)(q12),chtb(6)(q11),chr(16)(p11.1),der(7)t(7;14)(q32;q22),del(14)(q22)
2	46,XY [21]	chtb(1)(p11)
3	46,XY [24]	fra(1)(p12),fra(1)(q12),fra(9)(q12),chr(1)(p11),del(5)(q11.2),del(17)(q24), ?dup(17)(q22q25)
4	45,XY,-19[2] /46,XY[20]	fra(3)(q11),fra(8)(q24),fra(9)(q12),chtb(10)(q11)
5	45,XY,-18[3] /46,XY[14]	fra(6)(q14),fra(9)(q12),fra(X)(q26),chr(5)(q12),der(7)t(2;7)(q32;q36),del(2)(q32)
6	45,XY,-6[2] /46,XY[22]	fra(X)(q13),fra(2)(p13),fra(3)(p11),fra(5)(q11),fra(8)(q11),fra(9)(q12),chtb(4)(q31.1),Chtb(5)(p13),chtb(6)(q11),chr(9)(q12)
7	46,XY[23]	fra(2)(q24),fra(10)(q21)
8	45,XY,-8[2] /46,XY[21]	fra(9)(q12),add(11)(p15)
9	45,XY,-21[2] /46,XY[20]	fra(1)(p12),fra(6)(p12),fra(9)(q12)
10	46,XY[15]	fra(1)(p13),fra(9)(q12),chr(2)(q31),chtb(3)(p12)

Código	Complemento cromosómico	Observaciones
11	46,XY[19]	fra(9)(q12),fra(12)(q13)
12	46,XY[19]	fra(1)(p21),fra(3)(q13),fra(8)(p12),fra(8)(q22)
13	46,XY [25]	chtb(13)(q)
14	46,XY [24]	Sin alteraciones
15	46,XY [26]	fra(5)(q13),fra(9)(q12),fra(10)(q11.2),?i(5)(q10),47,XYY
16	46,XY [23]	fra(3)(p21),fra(9)(q12),chr(3)(q11),chr(6)(q11),chtb(10)(q11.2),dup(6)(p22p23)
17	46,XY[24]	fra(9)(q12),chr(2)(q11.2),chr(4)(p11),chr(6)(q11),chr(9)(q12)
18	46,XY[26]	fra(X)(q27),fra(9)(q12),fra(6)(q11)
19	46,XY[25]	fra(2)(q22),fra(2)(q22)
20	46,XY[20]	fra(8)(q11.2),chr(5)(q11),fra(9)(q12)
21	46,XY[23]	fra(3)(p21),fra(12)(q13)
22	46,XY[24]	Sin alteraciones
23	46,XY[21]	fra(9)(q12)x2,chr(9)(q12)
24	46,XY[23]	fra(2)(q11.2),chtb(3)(p13),del(Y)(q12),t(4;11)(q13;q23),t(13;14)(q34;q32)

**Tabla 6-9:** Resumen complementos cromosómicos del Grupo no expuesto

Código	Complemento Cromosómico	Observaciones
1	46,XY[18]	fra(9)(q12),chtb(4)(q31),del(6)(q22),del(2)(q16)
2	46,XY[17]	fra(9)(q12),del(10)(p12)
3	46,XY[23]	Sin alteraciones
4	46,XY[21]	Sin alteraciones
5	45,XY,-22[2]/46,XY[20]	inv(7)(p21q36), del(9)(p21)
6	46,XY[20]	chtb(1)(q11),chr(6)(q22),chtb(7)(q22)
7	46,XY[19]	fra(2)(q32), fra(3)(p21)
8	46,XY[11]	chr(12)(p11.2)
9	46,XY[22]	chtb(15)(q21)
10	46,XY[21]	fra(9)(q12)
11	46,XY[18]	Sin alteraciones
12	46,XY[23]	chtb(1)(p11),fra(9)(q12)
13	46,XY[20]	del(10)(p13),i(11)(q10)
14	45,X,-Y[2]/46,XY[19]	add(7)(p22)
15	46,XY[10]	Sin alteraciones

Considerando que, en este estudio piloto, se efectuó un emparejamiento por edades entre los individuos el grupo expuesto y el no expuesto, para el análisis estadístico, solamente se tuvieron en cuenta los datos pareados, en este caso, los comprendidos desde el 1 hasta el 15.

### 6.4.1 Frecuencia de fragilidades

En lo concerniente a la determinación de la frecuencia de fragilidades, se hallaron 46 fragilidades en el grupo expuesto y solo 6 en el grupo no expuesto, de estas, el 41% y el 66% respectivamente, correspondieron a una fragilidad del cromosoma 9, brazo q banda 12:fra9q12. Este resultado indica que, aunque esta no es una fragilidad exclusiva de los individuos expuestos a solventes, su frecuencia sí aumenta notoriamente en dicho grupo, en comparación con el grupo no expuesto (Ver Tabla 6-10 y Figura 6-14).

**Tabla 6-10:** Frecuencia fragilidades Grupo expuesto y No expuesto

Tipo de Fragilidad	Grupo expuesto		Grupo no expuesto	
	Número de metafases	Frecuencia /Fragilidades totales	Número de metafases	Frecuencia /Fragilidades totales
fra(X)(q13)	1	0,02	0	0
fra(X)(q26)	2	0,04	0	0
fra(1)(p12)	2	0,04	0	0
fra(1)(p13)	1	0,02	0	0
fra(1)(p21)	1	0,02	0	0
fra(1)(q12)	2	0,04	0	0
fra(2)(p13)	1	0,02	0	0
fra(2)(q24)	2	0,04	0	0
fra(2)(q32)	0	0	1	0,16
fra(3)(p12)	1	0,02	0	0
fra(3)(p11)	1	0,02	0	0
fra(3)(p21)	0	0	1	0,16
fra(3)(q11)	1	0,02	0	0
fra(3)(q13)	1	0,02	0	0
fra(5)(q11)	1	0,02	0	0
fra(5)(q13)	1	0,02	0	0
fra(6)(p12)	1	0,02	0	0
fra(6)(q14)	1	0,02	0	0
fra(8)(p12)	1	0,02	0	0
fra(8)(q11)	1	0,02	0	0
fra(8)(q22)	1	0,02	0	0
fra(8)(q24)	1	0,02	0	0

<b>fra(9)(q12)</b>	<b>19</b>	<b>0,41</b>	<b>4</b>	<b>0,66</b>
fra(10)(q11.2)	1	0,02	0	0
fra(10)(q21)	1	0,02	0	0
fra(12)(q13)	1	0,02	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>46</b>		<b>6</b>	

En cuanto al número de individuos, el 80% de los expuestos presentó fragilidades. De estos, el 76% presentó fra(9)(q12), mientras que en el grupo no expuesto, solo el 30% presentó fragilidades y de estos, el 26% mostró la misma fragilidad fra(9)(q12) (ver Tabla 6-11).

**Tabla 6-11:** Comparación frecuencia fragilidades por número de individuos

Grupo expuesto			Grupo No expuesto		
Fragilidades	Número de individuos	Frecuencia	Fragilidades	Número de individuos	Frecuencia
0	3	0,2	0	10	0,7
≥1	12	0,8	≥1	5	0,3
Total	15	1	Total	15	1

### 6.4.2 Aberraciones numéricas

El 30% de los expuestos mostró un complemento cromosómico anormal, caracterizado por mosaicismo (Figura 6-15) y en el que coexisten dos o más líneas celulares cromosómicas diferentes dentro de un mismo individuo. Con respecto al grupo de los no expuestos, este porcentaje fue del 10% (Tabla 6-12).

**Tabla 6-12:** Comparación frecuencia aberraciones numéricas

Grupo expuesto			Grupo no expuesto		
Aberraciones numéricas	Número de individuos	Frecuencia	Aberraciones numéricas	Número de individuos	Frecuencia
Normal	10	0,7	Normal	13	0,9
Anormal	5	0,3	Anormal	2	0,1
Total	15	1	Total	15	1

### 6.4.3 Aberraciones estructurales

Tanto el grupo expuesto como el no expuesto exhibieron la misma frecuencia de este tipo de aberraciones, cuyo valor fue del 30% (Tabla 6-13 y Figura 6-16). Sin embargo, en el caso del grupo expuesto, los cromosomas comprometidos fueron el 5, el 7, el 14 y el 17, mientras que en los no expuestos, los involucrados fueron el 7 y 10, esto fue determinado

teniendo en cuenta que dicha aberración se presentara como mínimo, en dos individuos diferentes.

**Tabla 6-13:** Comparación frecuencia aberraciones estructurales

Expuestos		
Anomalía estructural	Metafases	Frecuencia
del(Y)(q12)	1	0,08
del(2)(q32)	1	0,08
t(4;11)(q13;q23)	1	0,08
?i(5)(q10)	1	0,08
del(5)(q11.2)	1	0,08
dup(6)(p22p23)	1	0,08
der(7)t(2;7)(q32;q36)	1	0,08
der(7)t(7;14)(q32;q22)	1	0,08
add(11)(p15)	1	0,08
t(13;14)(q34;q32)	1	0,08
del(14)(q22)	1	0,08
del(17)(q24)	1	0,08
?dup(17)(q22q25)	1	0,08
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>	

No expuestos		
Anomalía estructural	Metafases	Frecuencia
del(2)(q16)	1	0,13
del(6)(q22)	1	0,13
add(7)(p22)	1	0,13
inv(7)(p21q36)	1	0,13
del(9)(p21)	1	0,13
del(10)(p12)	1	0,13
del(10)(p13)	1	0,13
i(11)(q10)	1	0,13
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	

Grupo expuesto			Grupo no expuesto		
Aberraciones estructurales	Número de individuos	Frecuencia	Aberraciones estructurales	Número de individuos	Frecuencia
0	10	0,7	0	10	0,7
≥1	5	0,3	≥1	5	0,3
Total	15	1,0	Total	15	1,0

#### 6.4.4 Roturas

En los cariotipos realizados, no solo fueron evidentes las anomalías numéricas y/o estructurales sino también la presencia de roturas de cromátide o de cromosoma, anomalías que resultan del rompimiento de una fragilidad (Figura 6-17). En el 60% de los expuestos aparecieron roturas de cromátide, de las cuales, el 23% se produjeron en la banda 11 del brazo corto del cromosoma 1 chtb(1)(p11), mientras que el 30% del grupo no expuesto presentó roturas en diferentes cromosomas (Ver Tabla 6-14).

**Tabla 6-14:** Frecuencia de roturas Grupo expuesto y No expuesto

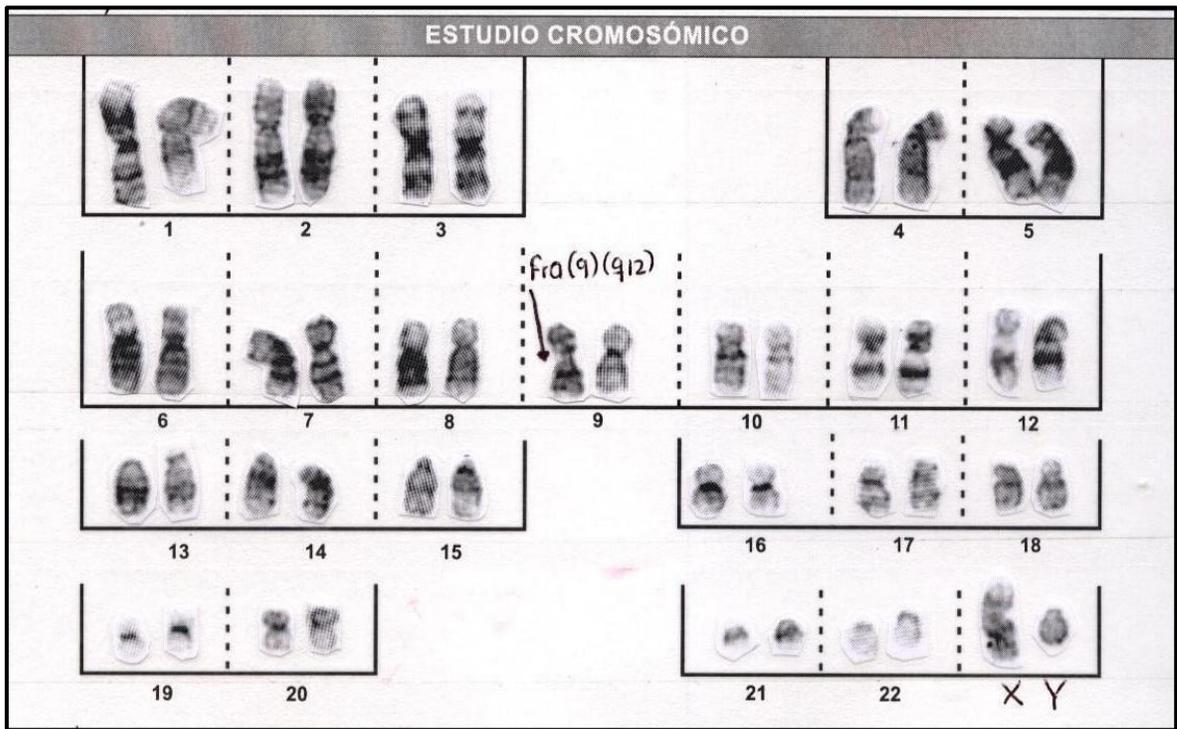
Roturas cromosómicas	Expuestos		No expuestos	
	Metafases	Frecuencia	Metafases	Frecuencia
chtb(1)(p11)	3	0,23	1	0,17
chtb(1)(q11)	0		1	0,17
chr(2)(q11.2)	1	0,08	0	0,00
chr(2)(q31)	0	0,00	0	0,00
chtb(3)(p12)	1	0,08	0	0,00
chtb(3)(p13)	0	0,00	0	0,00
chr(3)(q11)	0	0,00	0	0,00
chr(4)(p11)	0	0,00	0	0,00
chtb(4)(q31.1)	1	0,08	0	0,00
chtb(5)(p13)	1	0,08	0	0,00
chr(5)(q11)	1	0,08	0	0,00
chr(5)(q12)	0	0,00	0	0,00
chr(6)(p11)	0	0,00	0	0,00
chr(6)(q22)	0	0,00	1	0,17
chtb(6)(q11)	1	0,08	0	0,00
chtb(7)(q22)	0	0,00	1	0,17
chr(9)(q12)	1	0,08	0	0,00
chtb(10)(q11)	1	0,08	0	0,00
chtb(12)(p11)	0	0,00	1	0,17
chtb(13)(q)	1	0,08	0	0,00
chtb(15)(q21)	0	0,00	1	0,17
chr(16)(p11.1)	1	0,08	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>		<b>6</b>	

Grupo expuesto			Grupo no expuesto		
Número de roturas	Individuos	Frecuencia	Número de roturas	Individuos	Frecuencia
0	6	0,4	0	11	0,7
≥1	9	0,6	≥1	4	0,3

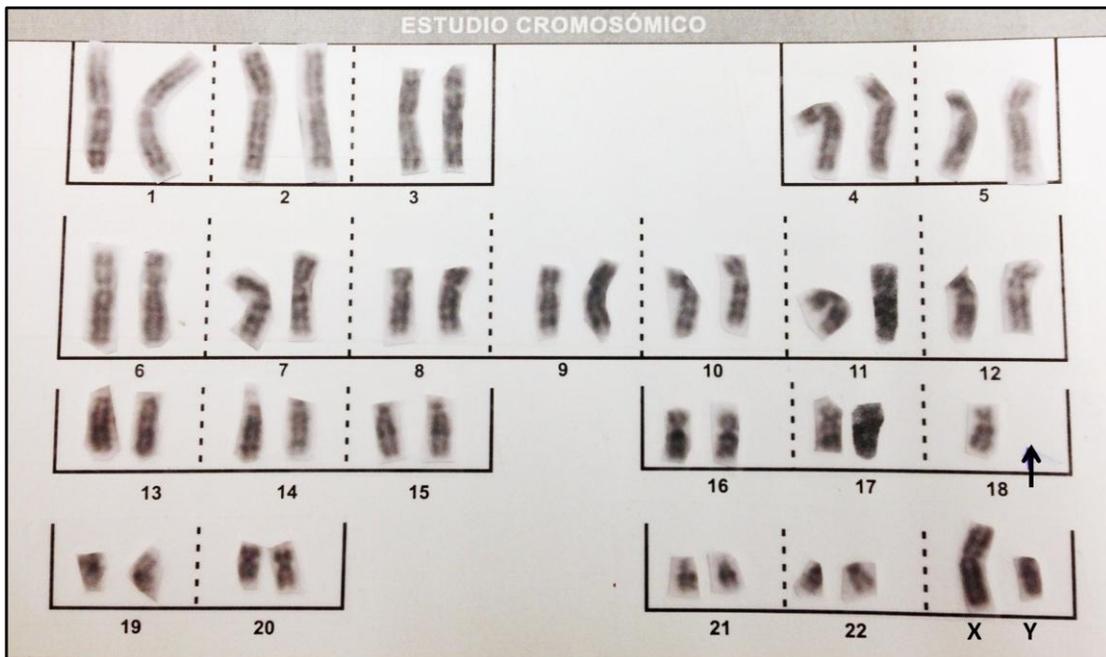
### 6.4.5 Cariogramas

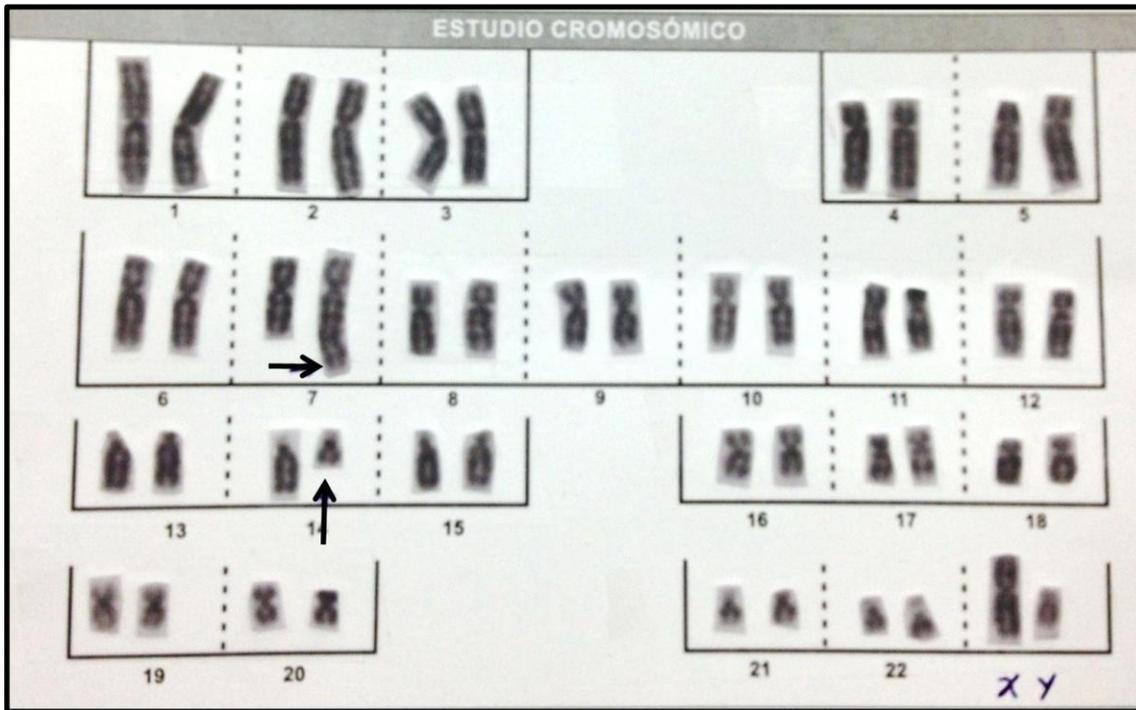
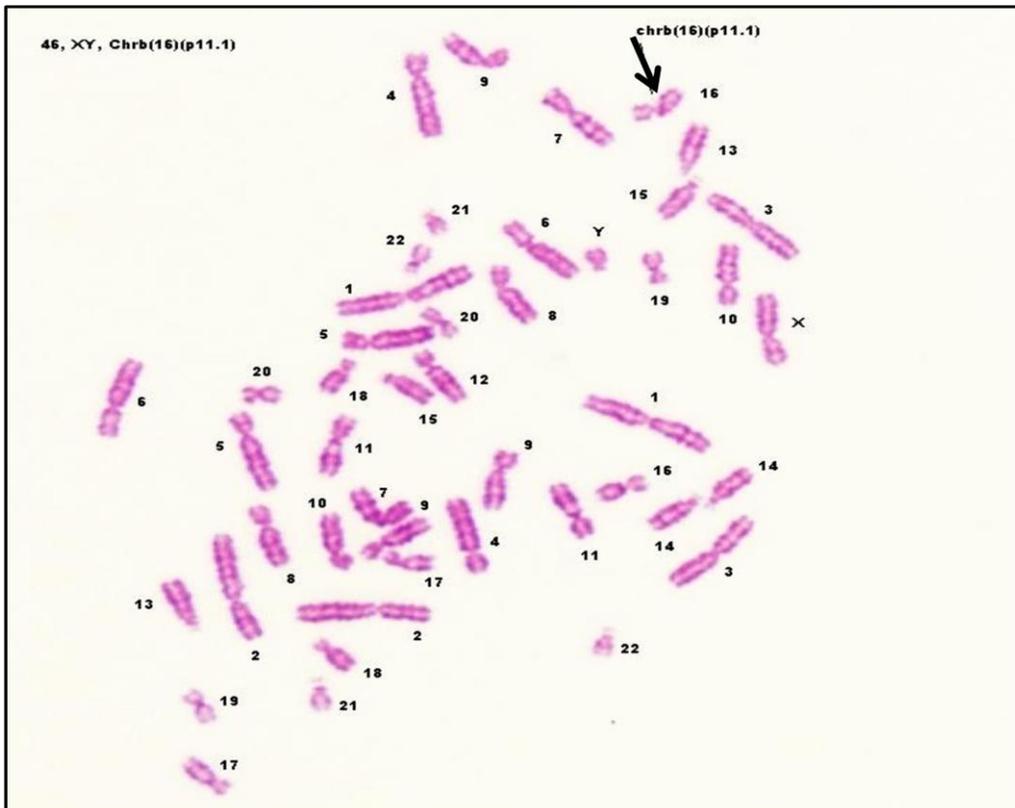
A continuación se muestran cariogramas representativos de las diferentes aberraciones y daños encontrados en los individuos analizados.

**Figura 6-14:** Cariograma normal. 46XY, fra(9)(q12) individuo expuesto. Aumento 100X



**Figura 6-15:** Monosomía. 45XY, -18, individuo expuesto. Aumento 100X



**Figura 6-16:** Translocación. 46, XY, der(7)t(7;14)(q32;q22), expuesto. Aumento 100X**Figura 6-17:** Rotura. 46, XY, chrb(16)(p11.1), individuo expuesto. Aumento 100X

Con el fin de determinación la presencia de aberraciones cromosómicas, se aplicó el *Test McNemar*, que tiene por objeto comparar si las frecuencias encontradas en los dos grupos evaluados son iguales o si existen diferencias significativas entre ellos. Este test es especialmente válido para el caso de datos pareados.

Así, fue posible establecer que hubo diferencias significativas en la frecuencia de fragilidades encontradas en el grupo expuesto ( $p < 0.001$ ) con relación al grupo no expuesto, con un índice de confianza mayor al 99% (Tabla 6-15). Este resultado permite afirmar que el aumento en el número y la frecuencia de fragilidades en los cromosomas de individuos ocupacionalmente expuestos, están asociados directamente con la exposición ocupacional a solventes, en comparación con el número y frecuencia de las fragilidades encontradas en los no expuestos.

**Tabla 6-15:** Estadísticos descriptivos de la determinación de aberraciones cromosómicas para los dos grupos de estudio

	Anomalía estructural noexp - anomalía estructural exp	Roturas noexp - Roturas exp	Fragilidades noexp - fragilidades exp	Anomalías numéricas noexp - Anomalías numéricas exp
Z	-0,108	-1,613	-2,956	-1,342
Sig. asintót. (bilateral)	0,914	0,107	0,003	0,18
Sig. exacta (bilateral)	1,000	0,172	0,001	0,375
Sig. exacta (unilateral)	0,5	0,086	0,000	0,188
Probabilidad en el punto	0,109	0,059	0,000	0,156

## 6.5 Relación entre el daño genotóxico y el tiempo de exposición a solventes

Finalmente, con el fin de determinar la posible relación que habría entre la cuantificación de daño en el ADN de individuos expuestos, medido como la presencia de cometas tipo 3 tipo 4, una concentración elevada de ADN libre circulante en suero y la presencia de aberraciones cromosómicas, y el tiempo de exposición ocupacional a solventes orgánicos, se llevó a cabo la prueba de correlación *Anova de medidas repetidas*, que asociaba dichas variables, donde la cuantificación de ADNlc de los expuestos era la variable dependiente y como variable independiente se tomó el tiempo de exposición. De acuerdo al modelo empleado se obtuvo una correlación con un valor de 0.248 (Tabla 6-16).

**Tabla 6-16:** Estadísticos descriptivos de la determinación de correlación daño en el ADN expuestos (ANDIc) – Tiempo de exposición.

			ANDIc dif	Tiempo Exposición (Meses)
Rho de Spearman	ANDIc dif	Coeficiente de correlación	1,000	0,248
		Sig. (bilateral)	.	0,164
		N	33	33
	Expuestos - Tiempo Exposición (Meses)	Coeficiente de correlación	0,248	1,000
		Sig. (bilateral)	0,164	.
		N	33	33

En lo concerniente a la correlación entre el daño en el ADN debido al tipo de cometa característico del grupo expuesto y el tiempo de exposición, se obtuvo un valor de 0.28. Ambos valores de correlación presentaron signo positivo, razón por la cual se infiere que existe una relación lineal o directa entre las dos variables analizadas (daño en el ADN del grupo expuesto, medido como ANDIc o tipo de cometa y el tiempo de exposición), pero sugiere que el tiempo de exposición no es la causa principal del incremento en el daño del ADN en los individuos expuestos.

De otro lado, también se realizó la prueba de *McNemar* para evaluar si hábitos como fumar o ingerir bebidas alcohólicas estaban asociados con el incremento en el daño del ADN, con el resultado de que en ninguno de los casos hubo diferencias significativas (Ver Tabla 6-17).

**Tabla 6-17:** Estadísticos descriptivos de la determinación de correlación daño en el ADN expuestos – hábitos.

Fumar	Valor	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Prueba de McNemar		0,549	0,274	0,161
N de casos válidos	33			
Alcohol	Valor	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Prueba de McNemar		0,219	0,109	0,094
N de casos válidos	33			

Adicionalmente, con el fin de medir los niveles de los solventes más comúnmente empleados, benceno, tolueno y xileno (Ver Tabla 6-18), el Instituto Nacional de Salud, realizó el monitoreo a la calidad del aire al interior de los talleres participantes en este estudio. Estos valores se compararon con los valores de referencia (Ver Tabla 6-19).

**Tabla 6-18:** Valores de solventes en el aire de talleres de pinturas de carros, barrio 7 de agosto, Bogotá.

Taller	Resultados Benceno en aire (ppm)	Resultados Tolueno en aire (ppm)	Resultados Xileno en aire (ppm)
1	0,33	10,74	28,92
2	0,31	27,22	115,2
3	0,43	21,5	108,35
4	0,3	25,27	101,54
5	0,18	9,55	19,34
6	0,1	14,5	67,3
7	0,1	13,2	52,6
8	No mta aire	No mta aire	No mta aire
9	0,34	8,25	70,12
10	0,2	12,8	35,7

**Tabla 6-19:** Valores de referencia para solventes en aire. Fuente: ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). 2011. TLVs and BEIs for Chemical Substances and Physical Agents.

SUSTANCIA	TLV - TWA	STEL
Benceno	0,5 ppm	2,5 ppm
Tolueno	20 ppm	-
Xileno	100 ppm	150 ppm

De los diez talleres participantes en el estudio, solamente fue posible realizar la medición en nueve, de estos, el 33% superaba en unas pocas ppm, los niveles máximos permitidos para dichos solventes en aire (de acuerdo a la referencia TLV-TWA).

# 7. Discusión

## 7.1 Tamaño de la muestra

Inicialmente se había determinado un tamaño de muestra de 40 individuos de cada grupo, para un total de 80, teniendo como referencia los resultados del estudio realizado por Heuser *et al* (2007), quien utilizó el DI (índice de daño o *damage index*) como medida del daño genético para el biomarcador de cometa. Solo fue posible reunir 33 individuos de cada grupo, para un total de 66. Considerando el carácter piloto de nuestro estudio, el tamaño de muestra está de acuerdo con el tamaño de muestra empleado en estudios anteriormente realizados en otros países, sobre la misma problemática. Así, Swanepoel, 2004, analizó 27 sujetos como grupo experimental y 9 sujetos como grupo no expuesto, en la evaluación de daño y reparación en el ADN de trabajadores expuestos a solventes orgánicos, mientras que, Zhang *et al* 2002, estudiaron solo 23 casos de leucemia asociada con la exposición al benceno. De otro lado, Santiago *et al* 2014, publicaron un estudio con 60 trabajadores de estaciones de gasolina expuestos a benceno, tolueno y xileno (BTX) y García *et al* 2012, llevaron a cabo un estudio similar, en el que participaron 34 hombres de ocupación pintores y expuestos a tolueno y 27 individuos como grupo control.

En resumen, el tamaño de muestra en un estudio piloto, está controlado por la hipótesis. Así, si teniendo un tamaño de muestra reducido, son evidentes las diferencias significativas entre los grupos evaluados, se considera que ese tamaño de muestra es el adecuado ya que fue concluyente, de esta manera se sustenta que el tamaño de muestra empleado en este estudio fue el conveniente.

## 7.2 Cuantificación de daño genotóxico por ensayo cometa

Dentro de las sustancias presentes en los solventes orgánicos empleados en la industria de pinturas de carros están, el tolueno y el benceno. Es bien sabido que el tolueno tiene propiedades tóxicas a nivel reproductivo y neuronal (Velandia, 2003), mientras que el benceno además de generar aplasia de la médula ósea (desaparición total o parcial de las células que se encuentran en esta) y daño en las células hematopoyéticas (Vélez *et al* 2007), está clasificado dentro del grupo I de agentes carcinogénicos para el hombre, según la IARC. Dichas sustancias ingresan al organismo principalmente por vía respiratoria pero, otra parte entra a través de la piel o del tracto digestivo. Una vez

ingresan al organismo son metabolizadas básicamente por los mismos sistemas enzimáticos, el complejo de enzimas citocromo p450 (Costa *et al* 2006, Mattia *et al* 1991). El producto principal del metabolismo del tolueno es el ácido hipúrico y los del benceno son el ácido S-fenilmercaptúrico y el ácido trans-trans-mucónico, sustancias que son eliminadas a través de la orina.

Sin embargo, algunos metabolitos intermedios del tolueno y del benceno pueden interactuar con el ADN. Esta interacción puede ocurrir como resultado de la formación de derivados de la oxidación de dichos solventes, los que a su vez generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que oxidan el ADN. En adición, los metabolitos de los solventes pueden formar enlaces covalentes con el ADN, lo que da inicio al proceso de modificación del material genético y, por tanto, a la generación de aductos o complejos estables. Estos aductos pueden resultar de la unión de grupos simples como metilo o etilo o también, de la unión de hidrocarburos aromáticos policíclicos con el ADN. Como consecuencia, se imposibilita la ocurrencia de los procesos de replicación o transcripción, pero además, pueden aparecer sitios álcali-lábiles o sensibles a la acción de agentes alcalinos, rompimientos de cadena simple (SSB) y rompimientos de cadena doble (DSB) del ADN (Swanepoel 2004). Como resultado, en caso de que ocurra replicación del ADN afectado, es posible que se generen mutaciones.

En este orden de ideas, se planeó el ensayo cometa en condiciones de pH alcalino ( $\text{pH} \geq 13$ ), pues permite detectar desde sitios álcali-lábiles hasta rompimientos de cadena doble, producidos por agentes genotóxicos. Mediante este ensayo se corroboró que en el grupo expuesto a solventes hubo un incremento en el ADN dañado, manifestado en la frecuencia de cometas tipo 3 (46%) y tipo 4 (21%), en comparación con el no expuesto, en el que el cometa más común fue el tipo 1 (82%) y en el que ningún individuo presentó cometas tipo 4, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

Nuestros resultados se relacionan con los hallados por Swanepoel, 2004, ya que nosotros encontramos frecuencia de cometas tipo 3 y tipo 4 en el 67% del grupo expuesto, asociados con un nivel de daño severo en el ADN, mientras que ellos encontraron diferencias significativas no solo en el tipo de cometa exhibido en los grupos analizados-grupo expuesto a solventes orgánicos (benceno) y grupo no expuesto- si no también en la respuesta celular (reparación) frente a la presencia de agentes genotóxicos. También lo encontrado en este estudio se corresponde con los resultados reportados por De Oliveira *et al* 2011, en donde se realizó el ensayo cometa en células bucales epiteliales y linfocitos, de trabajadores de la industria de pinturas, encontrándose diferencias significativas en el índice y frecuencia de daño en el ADN de del grupo expuesto frente al control. García *et al* 2012 también llegaron al mismo resultado, al evaluar la genotoxicidad y el daño oxidativo generado en pintores expuestos a bajos niveles de tolueno.

No obstante, también existen reportes en donde no se hallaron diferencias significativas entre los efectos genotóxicos generados por la exposición a solventes, Cárdenas-Bustamante *et al* 2007, concluyeron que, los bajos niveles de solventes orgánicos en la calidad del aire de la empresas evaluadas, probablemente no alcanzaban a inducir efecto

adverso en la salud de los individuos expuestos, explicando la ausencia de efectos genotóxicos en los individuos evaluados. De otro lado, vale la pena mencionar que la cantidad de tolueno retenida en el organismo está relacionada con el porcentaje de grasa presente, lo que hace que las personas obesas retengan más tolueno que las delgadas (Moser *et al* 1991). En este orden de ideas, el índice de masa corporal sería una medida importante para tener en cuenta a la hora de realizar este tipo de estudios.

En resumen, la aparición de lesiones en el ADN y su correcta reparación dependen del balance entre factores ambientales (exposición ocupacional a solventes orgánicos como posibles agentes genotóxicos) y factores internos (actividades metabólicas propias del organismo, tipo de célula, edad, ambiente extracelular). Bajo condiciones normales, cuando ocurre daño en el material genético, se pueden activar diferentes mecanismos de reparación del ADN, lo que significa que una misma lesión puede ser reparada a través de diversas vías. Este sistema de seguridad permite que, en caso de fallo o mutación en un mecanismo de reparación, puedan actuar otros. No obstante, cuando los mecanismos de reparación no son funcionales, pueden aparecer mutaciones que llevan a la célula a uno de los tres siguientes estados: senescencia, muerte celular programada o tumorigenesis (Swanepoel 2004).

### 7.3 ADN libre circulante por fluorescencia

La liberación de ADN al torrente sanguíneo se lleva a cabo básicamente por procesos de apoptosis, necrosis y lisis celular. Fluidos corporales como el plasma, el suero y la orina contienen fragmentos de ADN libre circulante. Es normal encontrar en individuos sanos, niveles bajos de ADN libre circulante, debido en mayor proporción a procesos de recambio celular, sin embargo, en individuos con patologías como tumores benignos y malignos, sepsis, inflamación, trauma y embarazo, entre otros, los niveles de ADN libre circulante son mucho mayores (Schwarzenbach *et al* 2011).

Nuestros resultados permitieron evidenciar que habían diferencias significativas ( $p=0.001$ ) entre la cantidad de ADNlc liberado al torrente sanguíneo, por parte del grupo expuesto ( $2439 \pm 1513$  ng/mL), frente al grupo no expuesto ( $1301 \pm 1276$  ng/mL). Dichas diferencias podrían explicarse con los resultados publicados por García *et al* 2012, en donde, a un grupo de pintores expuestos ocupacionalmente a bajos niveles de tolueno, se les realizó el test de peroxidación lipídica, el cual evalúa el daño debido a estrés oxidativo, encontrando que estos individuos presentaron un incremento en el daño oxidativo sugiriendo la participación de este solvente en el desarrollo de procesos de estrés. Esto hace que, en caso de que los sistemas de reparación del ADN no sean eficientes, cuando aumenta el daño oxidativo, la célula puede dar inicio al programa de apoptosis, lo cual explicaría el incremento en los niveles de ADN libre circulante en el suero de los individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos.

De otro lado, Al-Ghamdi *et al* 2004, concluyeron que la exposición a largo plazo a solventes orgánicos, está asociada con la apoptosis de las células de los túbulos

proximales de la nefrona, y por tanto, con la progresión de la fibrosis renal, afección asociada con la alta exposición a solventes. Estos hallazgos guardan coherencia con nuestros resultados acerca del aumento en los niveles del ADN libre circulante, en el grupo de individuos expuestos evaluados ( $2439 \pm 1513$  ng/mL).

De acuerdo a nuestros resultados, el 36% de los individuos que conformaron el grupo expuesto presentaron niveles elevados de ADN libre circulante, en contraste con el 33% de individuos del grupo no expuesto que presentaron niveles bajos, con una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) entre ambos, que permiten sugerir que la exposición ocupacional incrementa la concentración de ADN extracelular. No obstante, el grupo no expuesto tuvo un comportamiento heterogéneo frente a la cuantificación de ADNlc, pues presumíamos que todos presentarían valores similares. Esta diferencia podría ser el resultado de posibles errores en el método de separación del suero, de modo que es factible pensar que células nucleares de la sangre podrían haberse filtrado, para así contribuir al incremento en los niveles de ADN en algunas muestras. En adición, procesos metabólicos propios de cada individuo (mayor susceptibilidad del ADN al daño, mayor tasa de recambio celular, disminución en la reducción de especies reactivas de oxígeno endógenas, desbalances entre la tasa de fagocitosis mediada por macrófagos) pueden ser causantes de dicha heterogeneidad.

Si bien nuestro estudio es el que primero ha reportado la cuantificación de ADN libre circulante en individuos ocupacionalmente expuestos a solventes, también existen publicaciones en las que los niveles de ADNlc han sido evaluados en el plasma de individuos sanos en Colombia. Este hecho es interesante, pues nos permite comparar nuestros resultados del grupo no expuesto a solventes con los del estudio publicado por Salazar-Jordán *et al* 2009. Estos autores obtuvieron un valor promedio de 720 ng/mL de ADN libre circulante en plasma de personas sanas de la población bogotana y no encontraron diferencias significativas relacionadas con la edad o con el género de los participantes del estudio. En nuestro estudio, el valor promedio de ADNlc en suero fue de 1301 ng/mL. Como es evidente, nuestro resultado es de mayor magnitud. Sobre este punto, es factible pensar que diversos factores podrían ser responsables de tal diferencia, por ejemplo, el tipo de fluido corporal en el que se efectuó la determinación. Así, los valores obtenidos en suero suelen ser mayores que en plasma, teniendo en cuenta que en el suero es más probable que ocurra lisis celular.

También existen reportes que utilizan los niveles de ADN libre circulante como marcadores de daño en el marco de diversos procesos patológicos. Roth *et al* 2012, concluyeron que había una alta concentración de ADN libre en pacientes con tumores malignos y benignos, significativamente mayor que la encontrada en individuos sanos. Resultados similares fueron publicados por Doudevani *et al* 2008, quienes utilizando ratones inoculados con células de cáncer colon-rectal, encontraron que los niveles de ADN libre circulante estaban correlacionados con el tamaño del tumor y eran además significativamente mayores que los hallados en individuos sanos.

En conclusión, se podría inferir que la exposición ocupacional a solventes orgánicos está asociado con un incremento en los niveles de ADN libre circulante en el suero de individuos expuestos a dichas sustancias.

## **7.4 Evaluación del daño cromosómico mediante detección de aberraciones cromosómicas con bandas G**

En cuanto a la determinación de aberraciones cromosómicas y otras lesiones en el material genético, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de fragilidades entre el grupo expuesto y no expuesto ( $p < 0.001$ ). A pesar de que la fragilidad del cromosoma 9 fra9q12 fue la más frecuente y que no fue exclusiva del grupo expuesto, sí aumentó notablemente su número en el grupo expuesto.

Este hecho sugiere que el cromosoma 9 puede ser susceptible a las fragilidades y podría presentar sitios álcali-lábiles originados durante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Tice 1995), debido al efecto nocivo de los agentes genotóxicos que interfieren con la correcta compactación del ADN. Esta es la razón por la que existen regiones frágiles dentro de la molécula, donde pueden aparecer sitios abásicos con elevada vulnerabilidad, de modo que se pueden romper, lo que explicaría el hecho de que el 80% de los individuos expuestos a solventes presentaran fragilidades, frente a un 30% de los no expuestos. Este resultado está en relación con los hallazgos reportados por Rondón-Lagos *et al* 2006, en los que se determinó una alta frecuencia en la fragilidad fra9q12 en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.

No existen reportes previos de determinación de anomalías cromosómicas mediante el uso de citogenética convencional en individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos empleados en los talleres de pinturas de automotores. Hoyos-Giraldo *et al* 2009, realizaron un estudio similar, a un grupo de pintores de carros expuestos a solventes orgánicos, 400 hombres (200 expuestos 200 no expuestos), encontrando incremento de anomalías cromosómicas del tipo de intercambio de cromátides hermanas, corroborando nuestros hallazgos respecto a la asociación entre la exposición ocupacional a solventes y su efecto genotóxico.

De otro lado, se encontró que el cromosoma 5 estaba involucrado tanto con fragilidades como con aberraciones cromosómicas estructurales debidas a procesos de inserción y delección. Este resultado se relaciona con el reportado por Raina *et al* 2007, quienes identificaron una delección en el brazo largo (q) del cromosoma 5 de pacientes con leucemia.

La identificación de un incremento notable en la frecuencia de fragilidades espontáneas en el grupo expuesto reviste suma importancia si se considera que este fenómeno está

implicado con un aumento en el riesgo de aberraciones estructurales cromosómicas, las cuales podrían acumularse y producir inestabilidad del ADN (Escribano *et al* 2009).

En lo concerniente a la aparición de aberraciones numéricas, se encontró que el 30% de los individuos expuestos presentó pérdida de los cromosomas 2, 6, 8, 18 y 19, lo cual se correlaciona con lo encontrado por Ding *et al* 1983 quienes, en pacientes expuestos a benceno, observaron que las monosomías fueron más frecuentes en los cromosomas del grupo C (cromosomas del 6 al 12).

Con respecto a la posible correlación existente entre el incremento en el daño del ADN (aumento en los niveles de ADN libre circulante) y el tiempo de exposición a los solventes, solo se encontró una baja correlación (0.24), esto se contrapone con lo expuesto por Pinto *et al* 2000, quienes concluyeron que el daño citogenético (aberraciones cromosómicas), en pintores de exteriores, estaba significativamente asociado con el tiempo de exposición ocupacional a solventes.

Con relación a una posible asociación entre el aumento en el daño del ADN del grupo expuesto (aumento de aberraciones cromosómicas) y el hábito de fumar, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.27$ ), esto guarda concordancia con los resultados reportados por Srám *et al* 2006, quienes reportaron que este hábito no afectó el patrón de aberraciones cromosómicas presentes en individuos ocupacionalmente expuestos a diversas sustancias clastogénicas como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que están presentes en algunos disolventes de pinturas como el varsol.

Dentro del grupo de cromosomas involucrados en la aparición de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, tenemos los siguientes:

**Cromosoma 2.-** Representa casi el 8% del total del ADN nuclear. Dentro de los genes que alberga se destacan CCNT2, que codifica para la ciclina T2 reguladora de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), CREB1, factor que induce la transcripción de genes controlados por el AMP cíclico y NF-KB, factor que controla la transcripción del ADN frente a estímulos como el estrés (Yunis *et al* 1982).

**Cromosoma 5.-** Con alrededor del 6% del total del ADN de la célula, tiene una de las más bajas densidades de genes. Contiene el gen de la ciclina B, la cual forma con CDK1 el complejo denominado Factor promotor de la mitosis. Alberga además a GPX3, gen que codifica para glutatión peroxidasa-3 (GPX), enzima que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno (Cornish 2002).

**Cromosoma 6.-** Representa entre el 5.5 y el 6% del total del ADN de la célula. En él se encuentra el complejo mayor de histocompatibilidad, involucrado en la respuesta inmune del organismo. Además están CCND3, que codifica para la ciclina D3 reguladora de la progresión del ciclo celular, VEGFA que codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular (vasculogénesis) y SRF que codifica para el Factor de respuesta al suero, implicado en regulación de genes asociados con ciclo celular, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular. Otro gen allí localizado es p21, codificante de CDKN1A, proteína que regula la progresión de la célula durante la fase S del ciclo, pues inhibe los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4 (Mungall *et al* 2003).

*Cromosoma 7.*-Representa entre el 5 y el 5.5% del total del ADN de la célula. Contiene el cluster Homeobox A, secuencia de ADN que forma parte de los genes implicados en el desarrollo o morfogénesis (Gilbert 2002).

*Cromosoma 8.*-Representa entre el 4.5 y el 5% del total del ADN de la célula. En este se encuentra CCNE2, gen que codifica para la ciclina E2, la que en conjunto con CDK2 permite el paso de G1 a S en el ciclo celular (Suarez BK *et al* 2006).

*Cromosoma 14.*-Es un cromosoma acrocéntrico que contiene a GPX2, gen codificante de la glutatión peroxidasa-2 (GPX), enzima que cataliza la reducción de los hidroperóxidos orgánicos ingeridos (Tsujiimoto *et al* 1984).

*Cromosoma 17.*-Representa entre el 2.5 y el 3% del total del ADN de la célula. Aquí está localizado TP53, gen supresor tumoral que codifica para la proteína p53, asociada con procesos como detención del ciclo celular y apoptosis. Además comprende a BRCA1, otro gen supresor tumoral que regula el ciclo celular y evita la proliferación descontrolada. Su proteína forma parte del sistema de detección y reparación de daños en el ADN (Zody *et al* 2006).

*Cromosoma 18.*-Representa cerca del 2.5% del total del ADN de la célula. En él se encuentra SMAD4, un gen supresor tumoral situado en 18q21.1, el cual codifica a TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta). Este gen se encuentra frecuentemente mutado en células de cáncer de páncreas y de colon. También se encuentra BCL2, que codifica para una familia de proteínas reguladoras de la permeabilización de la mitocondria y de la vía intrínseca de la apoptosis (Nusbaum *et al* 2005).

*Cromosoma 19.*-En este cromosoma se ubica el gen APOE que codifica para la apolipoproteína E, reguladora de los niveles de colesterol en sangre (Gilbert 1997).

En conclusión, el 78% de los cromosomas involucrados en aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales encontradas en el grupo expuesto están asociados con genes que intervienen en procesos esenciales para la célula, como ciclo celular, supresión tumoral y producción de enzimas antioxidantes.

Este hallazgo, junto con los resultados obtenidos en el ensayo cometa y la cuantificación de ADN libre circulante, indican la magnitud de los efectos nocivos de la exposición laboral a los solventes de la pintura de autos, sobre la integridad del material genético y confirma lo consignado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) acerca de que la exposición ocupacional a solventes es un agente carcinogénico. A pesar de que este es el primer trabajo en el área de la exposición ocupacional a solventes que emplea la cuantificación de ADN libre circulante como estimador de daño en el ADN, nuestros resultados son prometedores en cuanto a la posibilidad de usarlo en un futuro como un biomarcador de detección temprana de daño en el material genético de individuos expuestos a solventes, y de esta manera ampliar su campo de acción, ya que solo es conocido su uso principalmente en el área de investigación del cáncer, aunque todavía se requieren estudios posteriores con un tamaño de muestra mayor. Teniendo en cuenta que todos estos ensayos tenían como objetivo evaluar el posible efecto genotóxico de dicha exposición, se evidenció diferencias significativas entre lo hallado en el grupo expuesto frente al grupo no expuesto, lo que permite inferir que la

exposición ocupacional aguda (corto tiempo pero a niveles altos) o crónica (largo periodo de tiempo pero a niveles bajos) a dichos solventes es un factor determinante en el surgimiento de efectos clastogénicos y genotóxicos en el ADN, que podrían desencadenar en procesos más complejos como la aparición del cáncer.

En lo concerniente a la no correlación entre el tiempo de exposición ocupacional a los solventes orgánicos y la determinación de daño en el ADN, evaluado por los tres ensayos propuestos (cometa, ADNlc y cariotipos), se sugiere que dicho efecto puede ser debido entre otros, a biomarcadores de susceptibilidad (factores genéticos), como por ejemplo, polimorfismos en ciertas enzimas, dichos polimorfismos pueden ser de dos tipos: Marcadores de polimorfismos de sistemas activadores y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los primeros permiten evaluar la actividad de las proteínas del citocromo P-450, abarcadas anteriormente, ya que son las que están involucradas en la toxicidad de ciertos xenobióticos como lo son el tolueno y el benceno, mientras que los segundos, miden la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión-S-transferasa, entre otras. De otro lado, la implementación de biomarcadores de efecto, como por ejemplo, un recuento linfocitario, asociado a la respuesta inmune, sería otro indicador de la alteración fisiológica del organismo frente a la exposición a dicho agente xenobiótico, Por lo anteriormente expuesto, se deben tener en cuenta también los biomarcadores de susceptibilidad y de efecto, en estudios de este tipo, ya que sirven de soporte para explicar la heterogeneidad en la respuesta de los individuos frente a un mismo agente, en este caso, la exposición ocupacional a solventes orgánicos.



# 8. Conclusiones y recomendaciones

## 8.1 Conclusiones

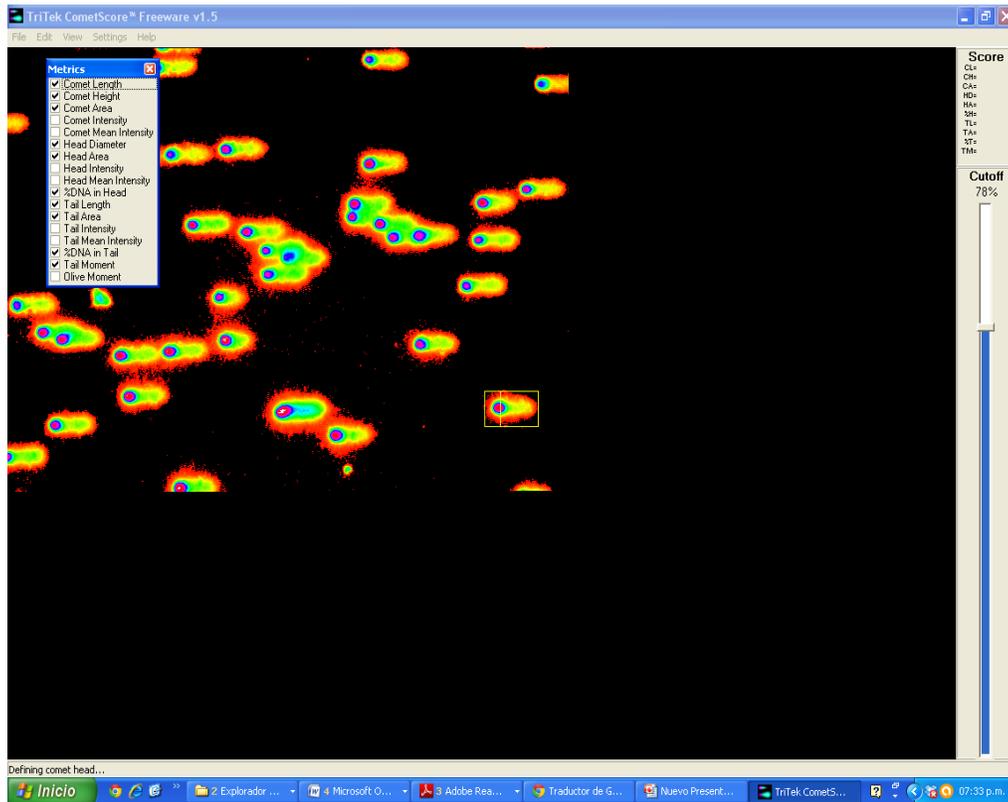
- El 46% de los individuos que conformaban el grupo expuesto presentaron cometas tipo 3, en el cual más del 50% del ADN total se encontraba fragmentado y fuera del núcleo, en comparación con el grupo no expuesto, donde el 82% presentaron cometa tipo 1, donde menos del 15% del ADN está fuera del núcleo, indicando que la exposición a solventes tiene un efecto genotóxico.
- Este es el primer trabajo que reporta la determinación de ADNlc como posible biomarcador de genotoxicidad temprana en individuos expuestos a solventes orgánicos.
- La concentración promedio de ADNlc en el suero del grupo de expuestos fue 2439 ng/mL, valor significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) a 1301 ng/mL valor hallado en el grupo de no expuestos, lo que indica que la exposición ocupacional a solventes tiene efecto genotóxico.
- Nuestros resultados no demostraron la clastogenicidad de los solventes orgánicos, en razón de que a pesar de aumentar la frecuencia de fragilidades en el 80% de los individuos expuestos, no incrementaron la frecuencia de roturas.
- Aunque se ha establecido que la exposición ocupacional a los solventes orgánicos puede provocar un aumento considerable del riesgo de daño genético en los trabajadores de la industria de la pintura de automotores, en nuestro trabajo no fue posible determinar una correlación entre el tiempo de exposición y

el aumento en el daño en el ADN, lo que sugiere que existen otros factores que podrían estar asociados con dicho fenómeno.

## 8.2 Recomendaciones

- Ampliar el tamaño de muestra del estudio en toda la localidad Barrios Unidos, Bogotá D.C.
- Llevar en forma periódica a los talleres de automotores, una brigada médica para reforzar el hábito de usar los elementos de protección personal.
- Implementar un observatorio epidemiológico en la localidad, con la inclusión de profesionales de otras disciplinas como médicos epidemiólogos, salubristas ocupacionales y toxicólogos, de la Escuela de Medicina de la Universidad del Rosario y otras instituciones.
- Para futuros estudios, calcular el índice de masa corporal (IMC) de los participantes, como factor a tener en cuenta en la realización de este tipo de estudios.
- Evaluar la posibilidad de la implementación de la prueba de ADNlc dentro del grupo de exámenes de ingreso y de seguimiento para los trabajadores del sector laboral estudiado.

# A. Anexo: Software Comet Score



## B. Anexo: Parámetros evaluados en software *Comet Score* en ensayo cometa para el grupo expuesto

Sample	Comet Length (μm)	Comet Height (μm)	Comet Area (μm)	Head Diameter (μm)	Head Area (μm)	%DNA in Head	Tail Length (μm)	Tail Area (μm)	%DNA in Tail	Tail Moment
SOL-1	170,8	106	10590	65,4	3653	37,4	105,4	6936	62,6	82,7
SOL-2	168,2	120,4	12487	50,2	4046	47,4	118	8440	52,6	89,4
SOL-3	139,8	79,1	7958	58,4	4018	65,8	81,4	3940	34,2	77,1
SOL-4	218,1	107,1	15773	68,6	4264	42	149,5	11508	58	122,5
SOL-5	152,2	75	8271	67	4413	66,1	85,2	3858	33,9	62,5
SOL-6	189,7	112,3	15557	50,8	3669	25,6	138,9	11887	74,4	112,7
SOL-7	94	75	4042	37,2	1718	39,2	56,8	2324	60,8	36
SOL-8	147,2	83,5	4520	46,8	1728	42,4	100,4	2791	57,5	67,5
SOL-9	188,1	89,3	8481	63,6	3337	51	124,5	5144	49	72,8
SOL-10	156,3	85,3	7013	60,2	3293	50,4	93,4	3720	49,6	50,2
SOL-11	118,3	91,2	7765	79,1	5374	73,6	37,3	2391	26,4	10,54
SOL-12	134	80	5863	72,4	4528	80,8	61,5	1334	21,3	22,54
SOL-13	127,3	85	6633	68,4	4088	63,6	59	2545	36,4	22,33
SOL-14	91,3	87,1	5836	80	5289	92	11,3	546	8,7	2,5
SOL-15	107,6	77,6	5284	48,2	2786	50,4	59,4	2498	49,5	35,3
SOL-16	192,4	92,9	7442	42,7	1844	25,2	149,7	5598	77,3	118
SOL-17	137,3	85,3	9636	57,6	3909	51,5	79,7	5727	48,5	49,3
SOL-18	220,7	76,3	4249	47,5	2424	52,9	173,2	2067	57,6	162,2
SOL-19	178	93,4	7135	42,9	1945	30	135,1	5190	73	107
SOL-20	163,5	87,9	8583	54,4	3694	49,6	109,1	4889	50,4	70,65
SOL-21	146	87	6316	45	2116	42	100,7	4210	62,1	75,6
SOL-22	96	78	7125	76	6724	90,4	20	400	9,6	3,2
SOL-23	97	74	6798	75	6567	93,6	23,7	241	7	4
SOL-24	78	66	3527	67	3124	90,0	13,9	403	16,8	5,8
SOL-25	80	65	4687	60	4179	85,3	20,0	508	14,7	3,7
SOL-26	112	66	4240	55,6	3077	64,7	56,0	1163	35,3	33
SOL-27	160	126	4846	60	2246	44,5	100,4	2600	55,5	59
SOL-28	203	71	4802	49,5	2621	60,6	153,4	2443	51,4	151
SOL-29	123	72	4033	55,6	2350	62,5	67,6	1683	37,5	58,7
SOL-30	148	96	7144	58	2479	48,2	90,0	4665	51,7	77,8
SOL-31	162	82	7176	61,2	3125	55,8	101,0	4051	49,7	57,2
SOL-32	174	79	6888	63,6	2781	53,5	110,0	4107	51,8	67,3
SOL-33	136	68	3792	48,6	1560	53,0	87,2	2232	52,2	51,8

## C. Anexo: Parámetros evaluados en software *Comet Score* en ensayo cometa para el grupo no expuesto

Sample	Comet Length (μm)	Comet Height (μm)	Comet Area (μm)	Head Diameter (μm)	Head Area (μm)	%DNA in Head	Tail Length (μm)	Tail Area (μm)	%DNA in Tail	Tail Moment
SOLC-1	73	59	3386	50	1946	83	26	1439	22	8
SOLC-2	49,6	48	1651	45,1	1519	90,4	7,5	132	15,8	3,8
SOLC-3	49	48	1676	46	1568	93	4	109	12	1
SOLC-4	139	82	9631	54	3385	56	84	6246	44	71
SOLC-5	73,1	60	3704	51,6	2438	84,5	21,5	1275	15,5	19
SOLC-6	76,3	61,8	3225	59,1	2589	88,5	21,5	636	17,8	19,7
SOLC-7	46,2	45	1302	42,8	1193	92,1	4,25	109	9,7	4
SOLC-8	47,3	43,5	1365	42	1241	91,6	7,6	124	10,5	2,4
SOLC-9	60	58,7	2586	56,4	2484	97,2	4	102	5,6	6,7
SOLC-10	80,6	60,3	2876	56,8	2396	89,4	23,8	480	17,1	10,3
SOLC-11	95	69	5977	53,2	3025	76	52,1	2953	30	31
SOLC-12	55,2	56	2088	53,3	2034	97	2,4	53	6,46	5,9
SOLC-13	59,3	55,7	2197	50,6	1883	86,7	8,7	313	14,6	2,8
SOLC-14	76,3	62	2930	56,6	2394	85,5	19,7	537	14,5	5,5
SOLC-15	65	53	1990	51	1726	92,2	14,2	264	8	12,3
SOLC-16	87	63,5	3471	57,6	2547	80	29,4	924	20	18,7
SOLC-17	73	68	3577	62,6	3165	88,5	12,8	412	16,3	4,2
SOLC-18	111	70,4	4351	57,4	2651	65	53,7	1736	35	31,8
SOLC-19	154	89	7360	45,5	2400	39	109	4960	65	81,3
SOLC-20	60	60	2678	55,4	2497	95	4,6	181	5,6	1,25
SOLC-21	58,4	55,7	2170	53,6	2021	93	5,3	149	7,7	1,4
SOLC-22	114,4	71,3	5406	68,7	4057	80,3	45,6	1349	23,6	41,3
SOLC-23	97	56,5	4188	58,4	2983	80,6	38,5	1204	19,4	17,3
SOLC-24	109	57,3	3062	50,6	2224	73,4	58,3	838	26,6	32,1
SOLC-25	79,1	59,1	2958	54,2	2421	86,2	25	537	15,5	7
SOLC-26	88,7	60,7	3328	57,3	2376	76,5	31,4	953	23,5	18
SOLC-27	59,4	56	2574	55,1	2454	96,4	4,3	120	5	2
SOLC-28	128,4	71	6881	58	3703	66,4	70,4	3177	33,6	35,9
SOLC-29	136,2	73,3	4969	66,6	3622	75,3	69,5	1347	26	7,6
SOLC-30	87	59,5	3342	59,5	2556	84,7	27,1	786	15,3	14,9
SOLC-31	93,3	62,1	3764	54,2	2514	76,7	39,1	1250	23,3	21
SOLC-32	96	62,7	4202	57	2797	76,9	38,5	1406	23,1	18,5



## Bibliografía

- Alberghini W, Perocco P, Bolognesi S. Toxic activity of seventeen industrial solvents and halogenated compounds on human lymphocytes cultured in vitro. *Toxicology Letters*. 1983; 16:69-75.
- Al-Ghamdi S., Raftery M. y Yaqoob M. Toluene and *p*-xylene induced LLC-PK1 apoptosis. *Drug Chem Toxicol*. 2004; 27:4, 425-432.
- Alix-Panabières C., Schwarzenbach H. y Pantel Klaus. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2012; 63:199-215.
- Aksoy M, Erdem S, Erdogan G, Dincol G. Acute leukaemia in two generations following chronic exposure to benzene. *Hum Hered*. 1974; 24:70–74.
- Axelson O, Hogstedt C. The health effects of solvents. En: Zenz C. Occupational Medicine. 3a ed. Editorial Mosby. San Luis. 1994; pp 764-778.
- Bauchinger M, Schmid E, Dresch J, Kolin-Gerresheim J, Hauf R, Suhr E. Chromosome changes in lymphocytes after occupational exposure to toluene. *Mutat Res*. 1982; 102:439–445.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal-Pra L, De-Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995; 79(2):133–135.
- Bonassi S. Combining environmental exposure and genetic effect measurements in health outcome assessment. *Mutat Res*. 1999; 16:177-185.
- Bonassi S, Neri M, Puntoni R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res*. 2001; 480-481:349-358.
- Brandt L. Exposure to organic solvents and risk of haematological malignancies. *Leukemia Res*. 1992; 16:67-70.
- Brown LM, Moradi T, Gridley G, Plato N, Dosemeci M, Fraumeni JF Jr. Exposures in the painting trades and paint manufacturing industry and risk of cancer among men and women in Sweden. *J Occup Environ Med*. 2002; 44:258–264.
- Cárdenas-Bustamante O, Varona-Urbe M, Patiño-Florez R. Bogotá paint-industry workers' exposure to organic solvents and genotoxic effects. *Rev Salud Pública* 2007; 9:275-288.
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD. Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res*. 2001; 478(1-2):89-96.
- Costa C, Pasquale RD, Silvari V, Barbaro M, Catania S. *In Vitro* evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol in Vitro*. 2006; 20:324-331.
- Cornish K., y Bramble D. Cri du chat syndrome: genotype-phenotype correlations and recommendations for clinical management. *Dev Med Child Neurol*. 2002; 44 (7):494–497.

- De Oliveira HM, Dagostim GP, Mota da Silva A, Tavares P, da Rosa L, de Andrade VM. Occupational risk assessment of paint industry workers. *Indian J Occup Environ Med.* 2011; 15(2):52–58.
- Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for benzene. 1997. Atlanta, GA. USA. [en línea]. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=40&tid=14> [2013-22-04]
- Ding X.J., Y Li., Y Ding y H.Z. Yang. Chromosome changes in patients with chronic benzene poisoning. 1983; *Chin Med J* (Engl), 96: 681-685.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 1981; 66(6):1191-1308.
- Douvdevani A, Goldshtein H, Hausmann J. A rapid direct fluorescent for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem.* 2009; 46:488-494.
- Douvdevani A., Czeiger D., Shaked G., Eini H., Vered I., Belochitski O., Avriel A. y Ariad S. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135:264-270.
- Dušan D. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo [en línea]. España: Chantal Dufresne, BA. 1998. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/mo1/33.pdf> [2013-22-04].
- ENTOX/TIWET (The Faculty of the Department of Environmental Toxicology and the Institute of Wildlife and Environmental Toxicology-Clemson University) Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology. En: Klaassen CD (ed). Casarett and Doull's Toxicology. Ed McGraw-Hill, 1996. USA, pp 883-905.
- EPA. Hazardous Waste Management System; Identification and Listing of Hazardous Waste; Paint Production Wastes; Land Disposal Restrictions for Newly Identified Wastes; CERCLA Hazardous Substance Designation and Reportable Quantities; Designation of n-Butyl Alcohol, Ethyl Benzene, Methyl Isobutyl Ketone, Styrene, and Xylenes as Appendix III Constituents; Addition of Acrylamide and Styrene to the Treatment Standards of F039; and Designation of Styrene as an Underlying Hazardous Constituent [online]. Disponible en internet. URL:<http://www.epa.gov/EPA-WATER/2001/february/day-13/w3087.htm> [2013-22-04]
- Escribano G., Castillo S., Daher V., Salazar S. y Tobella L. Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético. *Rev Hosp Univ Chile.* 2009; 20: 20-27.
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Kevekordes S, Mersch-Sundermann V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. *Toxicology.* 2004; 198(1-3):341-350.
- Ford E, Hamerton JL. The chromosomes of man. *Nature* 1956; 178:1020–1023.
- Forero, R.M. Cariotipo anormal. [En línea]. Disponible en [http://www.javeriana.edu.co/Genetica/PDFDOC/Cariotipo\\_anormal.pdf](http://www.javeriana.edu.co/Genetica/PDFDOC/Cariotipo_anormal.pdf) [2013-30-09]
- Formi A, Moreo L. Cytogenetic studies in a case of benzene leukaemia. *Eur J Cancer.* 1967; 3:251–255.

- Funes-Cravioto F, Kolmodin-Hedman B, Lindsten J, Nordenskjold M, Zapata-Gayon C, Lambert B, Norberg E, Olin R, Swensson A. Chromosome aberrations and SCEs in workers in chemical laboratories, and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. *Lancet* 1977; 2(8033):322-325.
- Gil F. El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Rev Toxicol.* 2000; 17(1):19-26.
- Gilbert F. Disease genes and chromosomes: disease maps of the human genome. Chromosome 19. *Genet Test* 1997; (2):145-9.
- Gilbert F Chromosome 7. *Genet Test.* 2002; 6 (2)141–61.
- González CA, Agudo A. Occupational cancer in Spain. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(Suppl 2):273–277.
- Heuser V. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect and susceptibility. *Toxicology.* 2007; 10:1-13.
- Heuser VD, de Andrade VM, da Silva J and Erdtmann B. Comparison of genetic damage in Brazilian footwearworkers exposed to solvent-based or water-based adhesive. *Mutat Res.* 2005; 583:85-94.
- Hoffman H, Speit G. Assessment of ADN damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res.* 2005; 581:105–114.
- Hoyos-Giraldo L., Carvajal S., Cajas-Salazar N., Ruiz M. y Sánchez-Gómez A. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res.* 2009; 666:8-15.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: wood, leather and some associated industries. 1981; 22, 222. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/mono77.pdf> [2013-21-04]
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–108. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf> [2013-21-04]
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Occupational exposure as a painter. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans IARC. 2010; 98:509-539. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol98/mono98-6.pdf> [2013-21-04].
- Instituto Nacional de Cancerología. *Cáncer Ocupacional. Actuar ya, es el reto.* [en línea]. Colombia: El Tiempo casa editorial. Disponible en: <http://www.cancer.gov.co/documentos/Eventos/C%C3%A1ncerocupacional.pdf> [2013-01-08]
- Iravathy Goud K, Shankarappa K, Vijayashree B, Prabhakar Rao K, Ahuja YR. DNA damage and repair studies in individuals working with photocopying machines. *IJHG (Indian J Hum Genet)* 2001; 1(2):139-143.
- Ji F, Wang W, Xia Z, Zheng Y, Qiu Y, Wu F, Miao W, Jin R, Qian J, Jin L, Zhu Y, Christiani D. Prevalence and persistence of chromosomal damage and susceptible genotypes of

- metabolic and DNA repair genes in Chinese vinyl chloride-exposed workers. **Carcinogenesis**. 2010; 31:648-653.
- Jiao J, Zheng Q, Chen Y, Deng Q, Bi X, Kim C, Holford T, Leaderer B, Boyle P, Ba Y, Xia Z, Chanock SJ, Rothman N, Zhang Y. Occupational solvent exposure, genetic variation of ADN repair genes, and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. **Eur J Cancer Prev**. 2012; 21(6):580-584.
  - Leon DA, Thomas P, Hutchings S. Lung cancer among newspapers printers exposed to ink mist: a study of trade union members in Manchester, England. **Occup Environ Med**. 1994; 51:87-94.
  - Little JB, Kelsey K, Wiencke J, Little F, Baker Jr. E. Sister chromatid exchange in painters recently exposed to solvents. **Environ Res**. 1989; 50:248-255.
  - Löf A, Johanson G. Toxicokinetics of organic solvents: a review of modifying factors. **Crit Rev Toxicol**. 1998; 28(6):571-650.
  - Lundberg I, Milatou-Smith R. Mortality and cancer incidence among Swedish paint industry workers with long-term exposure to organic solvents. **Scand J Work Environ Health**. 1998; 24:270-275.
  - Mandel P, Métails P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Siu-Long Y. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 1994; 3:67-71.
  - Mattia C, Lebel C, Bondy S. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. **Biochem Pharmacol**. 1991; 42:879-882.
  - Major J, Jakab M, Kiss G, Tompa A. Chromosome aberration, sister-chromatid exchange, proliferative rate index, and serum thiocyanate concentration in smokers exposed to low-dose benzene. **Environ Mol Mutagen**. 1994; 23:137-142.
  - McDonald D. Cytogenetics Information Site. 2008. [En línea]. Disponible en <http://www2.uah.es/biomodel/citogene/dynacare/geninfo.htm#mosaicism> [2013-01-05].
  - Ministerio de la Protección Social. *Informe de enfermedad profesional en Colombia 2001-2002*. Colombia. [en línea]. Imprenta Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.istas.net/upload/Enf%20profesional%20Colombia.pdf>
  - Monografía Cromosomas y enfermedades. Anomalías cromosómicas. 2004. [En línea]. Disponible en <http://www.iqb.es/cromosomas/anomalias.htm> [2014-30-03]
  - Moro, A., Brucker, N., Charão, M., Bulcão, R., Freitas, F., Baierle, M., Nascimento, S., Valentini, J., Casini, C., Salvador, M., Linden, R., Thiesen F., Buffon A., Moresco R. y García C., S. Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. **Mutat Res**. 2012; 746:42-48.
  - Moser G., y McLachlan S.A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans. **Chemosphere**. 1999; 39:9, 1513-1521.
  - Mungall A., Palmer S., Sims S., Edwards C., Ashurst J., Wilming L., Jones M., Horton R., Hunt S., Scott C., Gilbert J., Clamp M., Bethel G., Milne S., Ainscough R., Almeida J., Ambrose K., Andrews T., Ashwell R., Hubbard T., Sulston J., Dunham I., Rogers J. y Beck S. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*. 2003; 425:805-811.

- Muñoz, U. Anomalías cromosómicas. 2008. [En línea]. Disponible en [http://www.eurogentest.org/fileadmin/templates/eugt/leaflets/pdf/spanish/chromosome\\_changes.pdf](http://www.eurogentest.org/fileadmin/templates/eugt/leaflets/pdf/spanish/chromosome_changes.pdf) [2014-30-03]
- Navarro C. Anomalías estructurales de los cromosomas. [en línea]. Disponible en <http://mural.uv.es/monavi/disco/primerobiologia/Tema37.pdf> [2013-01-05].
- NIOSH, National Occupational Exposure Survey 1981–1983. [en línea]. Cincinnati, OH, USA. 1983. Disponible en: <http://www.cdc.gov/noes/> [2013-21-04]
- Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J National Cancer Inst.* 1960; 25:85–109.
- Nusbaum CH., Zody M., Borowsky M., Kamal M., Kodira Ch., Taylor T., WHITTAKER c., Chang J., Cuomo C., Dewar K., FitzGerald M., Yang X., Abouelleil A. DNA sequence and analysis of human chromosome 18. *Nature.* 2005; 437:551-555.
- Pinto D, Ceballos JM, Garcia G, Guzman P, Del Razo LM, Vera E, Gómez H, García A, Gonsebatt ME. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat Res.* 2000; 467, 105-111.
- Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res.* 1999; 441:115-127.
- Raina V.P., Iravathy K., Surya M.P. y Prasanna R. Analysis of risk factors and cytogenetic anomalies in North Indian leukemia patients. *Apollo Med.* 2007; 4(1)22:28.
- Rodríguez R. Las toxinas ambientales y sus efectos genotóxicos [en línea]. México: Fondo de cultura económica. 1995. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html> [2013-21-04]
- Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J, Mayan O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res.* 2006; 604:19–27.
- Rondón-Lagos M., Caicedo J. y Robledo J.F. Determinación de anomalías cromosómicas y secuencias de AND amplificadas en cáncer de mama. *Rev. Cienc. Salud.* Bogotá (Colombia). 2006; 4(2):7-22.
- Roth C., Pantel K., Müller V., Rack B., Kasimir-Bauer S., Janni W. y Schwarzenbach H. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer.* 2011; 11:4.
- Roth M, Viégas J, Roth D. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res.* 2003; 2:410-417.
- Rundell M, Wagner E, Plewa M. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 42:61-67.
- Salazar-Jordán H., García-Robayo D., Amaya J., Castillo M., Briceño I. y Aristizábal F. Cuantificación de AND libre en plasma sanguíneo de voluntarios sanos en una población bogotana. *NOVA- Publicación científica en Ciencias Biomédicas.* 2009. 7812): 111-174.

- Santiago F., Alves G., Barros U., Tabalipa M., Rios L., Kosyakova N., Ornellas M. y Liehr T. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenetics*. 2014, 7:15.
- Shwarzenbach H., Hoon D. y Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature*. 2011; 11:426-438.
- Sellyei M, Kelemen E. Chromosome study in a case of granulocytic leukaemia with 'Pelgerisation' 7 years after benzene pancytopenia. *Eur J Cancer*. 1971; 7:83–85.
- Smith M, Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg R, Dosemeci M, Rappaport S, Shen M, Alter B, Wu Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin Ch, Guo W, Chanock S, Hayes R, Linet M, Kim S, Yi S, Rothman N. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*. 2004; 306 (5702):1774-1776.
- Snyder R, Andrews L. Toxic Effects of Solvents and Vapors. En: Klassen C. Cassarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 5a ed. Editorial McGraw-Hill. 1996. New York. pp. 737-772.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Siu-Long Y. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994; 3:67–71.
- Srám R., Beskid O., Dusek Z. y Solanský I. The effects of exposure to different clastogens on the pattern of chromosomal aberrations detected by FISH whole chromosome painting in occupationally exposed individuals. *Mutat Res*. 2006; 594:20–29.
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The origin and mechanism of circulating ADN. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 906:161–168.
- Suarez BK., Duan J., Sanders AR. [Genomewide linkage scan of 409 European-ancestry and African American families with schizophrenia: suggestive evidence of linkage at 8p23.3-p21.2 and 11p13.1-q14.1 in the combined sample.](#) *Am. J. Hum. Genet*. 2006; 78 (2):315–33.
- Sul D, Lee E, Lee MY, Oh E, Im H, Lee J, Jung WW, Won N, Kang HS, Kim EM, Kang SK. DNA damage in lymphocytes of benzene exposed workers correlates with *trans,trans*-muconic acids and breath benzene levels. *Mutat Res*. 2005; 582:61–70.
- Svensson BG, Nise G, Englander V, Attewell R, Skerfving S, Moller T. Deaths and tumors among rotogravure printers exposed to toluene. *Br J Ind Med*. 1990; 47:372–379.
- Swanepoel AJ. Evaluation of DNA damage and DNA repair by the comet assay in workers exposed to organic solvents. Thesis (M.Sc. (Occupational Hygiene))-North-West University, Potchefstroom Campus, 2004. En: <http://hdl.handle.net/10394/1482>.
- Tasaka T, Nagai M, Sasaki K, Murata M, Taoka T, Ikeda K, Tanaka T, Abe T, Takahara J, Irino S. Translocation (3;21) (q26.2;q22.1) found in a patient with myelodysplastic syndrome and long-term exposure to organic solvents. *Br J Haematol*. 1992; 82:473–475.
- Tice R. The single cell gel comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. *Environ Mutagen*. 1995; 315-339.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Method development. *Mutat Res*. 1992; 271:69-77.

- Tong-man O, Nagalakshmi K. Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res.* 1999; 437:175-194.
- Torres CH, Varona ME, Lancheros A, Patiño RI, Groot H. DNA damage assessment and biological monitoring of occupational exposure to organic solvents, 2006. *Biomedica* 2008; 28:126–138.
- Tsujimoto Y., Finger LR., Yunis J., Nowell PC. y Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14:18) chromosome translocation. *Science.* 1984; 226 (4678):1097-1099.
- Van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1137:18-26.
- Velandia E. Velocidad de Conducción Nerviosa en trabajadores que manejan Solventes Orgánicos. *Rev del Consejo Colombiano de Seguridad.* 2003. 11:40.
- Vélez M, Velandia E, Venegas M. Guías de Atención Integral de Salud Ocupacional Basada en la Evidencia para Trabajadores expuestos a Benceno y sus Derivados ( Gatiso – BTX-EB). [En línea]. Ministerio de la protección Social. Bogotá, Colombia. 2007; 39-117. Disponible en [http://www.susalud.com/guias/guia\\_gatiso\\_exposicion\\_benceno.pdf](http://www.susalud.com/guias/guia_gatiso_exposicion_benceno.pdf) [2014-06-16]
- Vigliani EC, Forni A. Benzene, chromosome changes and leukemia. *J Occup Med.* 1969; 11:148–149.
- Yang CS, Hildesheim A, Dosemeci M, Chan Ch, Chen ChJ, Cheng YuJ, Hsu M, Chen IH, Mittl B, Sun B, Levine P, Chen JY, Brinton L. Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidem Biomar.* 2001; 10:1145-1153.
- Yardley J, Anderson D, Lovell DP, Jenkinson PC. Analysis of chromosomal aberrations in workers exposed to low level benzene. *Brit J Ind Med.* 1990; 47:48-51
- Yunis and Prakash. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science.* 1982; 215:1525–1530
- Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis.* 2001; 16:359-369.
- Zhang L, Eastmond D, Smith MT. The Nature of Chromosomal Aberrations Detected in Humans Exposed to Benzene. *Crit Rev Toxicol.* 2002; 32(1):1–42.
- Zhang Y, Deng Q, Zheng T, Lan Q, Lan Y, Holford T, Chen Y, Dai M, Leaderer B, Boyle P, Chanock S, Rothman N. Occupational solvent exposure, genetic variation in immune genes, and the risk for non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22:77-82.
- Zhu T, Lam C, Jiang C. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat Res.* 2001; 491:173-181.
- Zody M., Garber M., Adams D., Sharpe T., Harrow J., Lupski J., Nicholson C., Searle S., Wilming L., Young S., Abouelleil A., Allen N., Bi W, Bloom T., Mark L. Borowsky M., Boris E. Bugalter B., Butler J., Jean L. Chang J., Chen Ch., Cook A., Corum B., Cuomo C., De Jong P., DeCaprio D., Dewar K., FitzGerald M., Gilbert J., Gibson R., Bradley A., Hubbard T., Bruce W., Birren B., Rogers J., Lander E. y Nusbaum C. DNA sequence of human

chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *Nature*. 2006; 440:1045-1049.