

**EFFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A  
COMBUSTIBLES EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO, EVALUADO  
MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS, EN LA CIUDAD DE  
POPAYÁN**

**ADRIANA MARIA MUÑOZ QUINTERO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2005**

**EFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A  
COMBUSTIBLES EN LAS ESTACIONES DE SERVICIOS, EVALUADO  
MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS, EN LA CIUDAD DE POPAYÁN**

**ADRIANA MARIA MUÑOZ QUINTERO**

**Trabajo de Grado  
Para optar al título de Bióloga**

**Mg. LUZ STELLA HOYOS  
Directora**

**Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL  
Asesor**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2005**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

Directora

---

Mg. LUZ STELLA HOYOS

Jurado

---

Mg. PATRICIA EUGENIA VÉLEZ

Jurado

---

Ph.D NOHELIA CAJAS

Fecha de sustentación: Popayán, 21 de junio de 2005

*Por permitirme concluir con éxito esta etapa de mi vida*

*A Dios*

*A mi madre*

*A mis tías*

*A mi familia*

*A mi novio y amigos*

*A mi Directora del trabajo*

*Con amor...*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios por permitirme concluir con éxito esta etapa de mi vida.

De manera muy especial agradezco la valiosa colaboración de las personas objeto de estudio del grupo expuesto y del grupo control, que contribuyeron a la realización de esta investigación.

A mi Madre por su profundo e incondicional amor, dedicación y apoyo que me ha brindado durante toda mi vida permitiendo mi realización personal y profesional.

A mis tías maternas y familia por sus enseñanzas, gran apoyo y colaboración.

A la Mg. Luz Stella Hoyos por su dedicación, apoyo, entrega al orientar este trabajo, fortalecer mi formación académica y por su gran calidad humana.

Al Mg. Silvio Carvajal por su colaboración durante el desarrollo del trabajo.

A la Mg. Patricia Vélez por su valiosa colaboración en la evaluación del trabajo.

A la Ph.D Nohelia Cajas por su gran ayuda en la evaluación del trabajo

A Javier Yarce y familia por brindarme su apoyo y colaboración durante todo el desarrollo del trabajo.

A Mileidy Quintero, Fabián Quintero, Angie Quintero por brindarme su amor y apoyo.

A todos mis amigos; Nancy Guerrero, Diana Muñoz, Juan Carlos Tafur, Soledad Ordóñez, John Jaime Delgado, Felipe Yasnó, Lorena Bolaños, en especial a mi mejor amigo y compañero Luis Alfonso Ruiz y al Grupo de Toxicología Genética y Citogenética por su gran apoyo y colaboración.

## CONTENIDO

|   | Pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN  | 15   |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA   | 17   |
| 2. HIPÓTESIS  | 19   |
| 3. JUSTIFICACIÓN  | 20   |
| 4. OBJETIVOS  | 22   |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL  | 22   |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 22   |
| 5. ANTECEDENTES   | 23   |
| 6. MARCO TEÓRICO  | 31   |
| 6.1 ¿QUE SON LOS COMBUSTIBLES?  | 31   |
| 6.2 COMBUSTIBLES DEL PETRÓLEO   | 31   |
| 6.3 COMBUSTIBLES DISTRIBUIDOS EN ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE POPAYÁN | 32   |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.3.1 La gasolina  | 32        |
| 6.3.2 El diesel  | 34        |
| 6.3.3 Evaporación de los Combustibles en las Estaciones de Servicio                      | 35        |
| 6.3.4 Marcador para productos del petróleo   | 36        |
| <b>6.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN SURTIDORES DE COMBUSTIBLE EN ESTACIONES DE SERVICIO</b> | <b>36</b> |
| 6.4.1 Procedimientos para tener el menor contacto con los combustibles                   | 36        |
| 6.5 PRUEBAS CITOGENÉTICAS  | 36        |
| 6.6 LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA: CÉLULAS CENTINELAS                                  | 37        |
| 6.7 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS (MN)  | 37        |
| 6.7.1 La prueba de micronúcleos convencional   | 39        |
| 6.7.2 La prueba de micronúcleos con Citocalasina-B                                       | 39        |
| 6.7.3 Significancia biológica de la prueba de micronúcleos                               | 40        |
| 7. METODOLOGÍA   | 41        |
| 7.1 TIPO DE ESTUDIO  | 41        |

|   |    |
|---|----|
| 7.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO   | 41 |
| 7.3 MOTIVACIÓN E INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO  | 41 |
| 7.4 SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO  | 41 |
| 7.5 DISEÑO MUESTRAL   | 42 |
| 7.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA  | 43 |
| 7.7 ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE   | 43 |
| 7.8 CULTIVO DE LINFOCITOS   | 43 |
| 7.9 COSECHA DE LINFOCITOS   | 43 |
| 7.10 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS  | 44 |
| 8. RESULTADOS   | 45 |
| 8.1 CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACION DE ESTUDIO   | 45 |
| 8.2 EFECTO GENOTOXICO POR LA EXPOSICION OCUPACIONAL A COMBUSTIBLES  | 45 |
| 8.3. ASOCIACIÓN ENTRE NÚMERO PROMEDIO DE MICRONÚCLEOS, EDAD Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LOS COMBUSTIBLES (AÑOS). | 47 |
| 8.4 REGISTRO FOTOGRÁFICO  | 49 |



|                  |    |
|------------------|----|
| 9. DISCUSION     | 51 |
| 10. CONCLUSIONES | 55 |
| 11. IMPACTO      | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA     | 57 |
| ANEXOS           | 67 |

## LISTA DE TABLAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1 Características demográficas de la población de estudio                              | 45   |
| Tabla 2 Numero promedio de Micronúcleos del grupo expuesto a combustibles y del no expuesto. | 46   |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Pag. |
|--|------|
| Figura 1. Estación de servicio de la ciudad de Popayán   | 32   |
| Figura 2. Origen de los micronúcleos   | 38   |
| Figura 3. Vendedores de servicio   | 41   |
| Figura 4. Número promedio de micronúcleos del grupo expuesto a combustibles respecto al grupo no expuesto                            | 46   |
| Figura 5. Análisis de asociación lineal entre el número promedio de micronúcleos y la edad (años)                                    | 47   |
| Figura 6. Análisis de asociación lineal entre el número promedio de micronúcleos y el tiempo de exposición a los combustibles (años) | 48   |
| Figura 7. Panorámica de células binucleadas, 40X   | 49   |
| Figura 8. Células binucleadas (BN) de linfocitos humanos generadas por bloqueo de citocinesis con Citocalasina-B, 100X.              | 49   |
| Figura 9. Células binucleadas con micronúcleos (MN), 100X.   | 50   |

## **LISTA DE ANEXOS**

|  | Pág. |
|--|------|
| Anexo A Encuesta corta                     | 67   |
| Anexo B Encuesta larga                     | 68   |
| Anexo C Consentimiento Informado           | 69   |
| Anexo D Tabla maestra de registro de datos | 72   |

# **EFFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A COMBUSTIBLES EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO, EVALUADO MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS, EN LA CIUDAD DE POPAYÁN**

## **RESUMEN**

Los combustibles derivados del petróleo son muy usados en el mundo, y son distribuidos al público en estaciones de servicio, por los vendedores de servicio, este trabajo lo hacen sin ninguna protección, no usan implementos de protección (guantes, caretas, etc.). Los combustibles contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales son carcinogénicos y han sido asociados con efectos genotóxicos. El benceno es un hidrocarburo aromático, este compuesto es considerado por la IARC como un carcinógeno humano y los vapores de la gasolina como posible cancerígeno por tener este compuesto. La exposición ocupacional al benceno ha sido principalmente asociada con un aumento en la incidencia de leucemias. Estudios Epidemiológicos muestran que hay una relación entre el aumento en la frecuencia de MN y exposición al benceno.

En la población de vendedores de servicio se han realizado diferentes pruebas citogénicas. Sin embargo, los datos de estos estudios son contradictorios, porque en algunos se han encontrado diferencias significativas pero en otros no. Los vendedores de combustibles no sólo se exponen a los hidrocarburos presentes en los vapores de los combustibles por inhalación, sino también por la vía epidérmica

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto genotóxico por la exposición ocupacional a los combustibles en vendedores de servicios de la ciudad de Popayán, empleando la prueba de micronúcleos (MN). Los MN son un biomarcador útil para evaluar daños genotóxicos causados por la exposición ocupacional a los combustibles

Se seleccionó un grupo 20 vendedores expuestos a los combustibles como mínimo por cinco años, todos no fumadores y otro grupo control de 20 individuos. Se tomaron muestras de sangre periférica, se establecieron dos cultivos de 5 mL por individuo, incubados a 37°C por 72 horas, luego de 44 horas de incubación los cultivos fueron tratados con Citocalacina-B, para inhibir la citocinesis y obtener células binucleadas, a las 72 horas las células fueron cosechadas. Las preparaciones citogénicas fueron coloreadas con giemsa, se analizaron al microscopio 2000 células binucleadas por individuo y se registraron los MN en las tablas maestras.

Los datos fueron ingresados al programa Excel y una vez organizados se transfirieron al paquete estadístico SPSS para su análisis estadístico descriptivo y referencial. Los resultados mostraron que entre los dos grupos no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ), indicando que estos fueron apareados homogéneamente en cuanto a características tenidas en cuenta para su selección.

El número promedio de micronúcleos / 2000 células binucleadas es estadísticamente significativo ( $P = 0,000$ ) en el grupo expuesto a combustibles ( $7.994 \pm 0.640$ ) con relación al grupo no expuesto ( $4.366 \pm 0.627$ ). También se encontró que el tiempo de exposición incide en un 74.3% en el número promedio de MN y que no existe una relación estadísticamente significativa entre la edad y el número promedio de MN, tanto en los individuos del grupo control como del grupo expuesto.

La exposición a combustibles tiene un efecto genotóxico para los linfocitos de los vendedores de combustibles, incrementando la frecuencia promedio de MN. Este estudio permitió identificar los efectos genotóxicos precoces causados por la exposición ocupacional a los combustibles, lo cual servirá para concientizar a la población afectada para que tomen medidas preventivas que les permitan disminuir o eliminar la exposición a los combustibles y el riesgo de desarrollar enfermedades de origen ocupacional como el cáncer.

Identificar a tiempo los efectos genotóxicos causados por la exposición ocupacional en las personas que aún no presentan problemas de salud, permitirá motivar al diseño de estrategias para reducir la exposición y el riesgo de desarrollar enfermedades de origen ocupacional.

**Palabras Claves:** Benceno, Citocalacina-B, Combustibles derivados del petróleo, Estaciones de servicio, Interfase, Linfocitos humanos de sangre periférica, Micronúcleos (MN), Vendedores de combustibles.

## INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos sugieren que muchas enfermedades son producidas por la interacción entre factores ambientales y genéticos, (Evans, 1977). Las enfermedades de origen ambiental son prevenibles en su gran mayoría, si los factores de riesgo son identificados, reducidos o eliminados; Esto sería una estrategia muy eficaz para disminuir la problemática de salud pública ambiental en un país.

Agentes químicos como el petróleo y sus derivados alteran el material genético en células eucariotas. El petróleo en la actualidad es uno de los combustibles más usados y explorados en el mundo; compuesto por mezcla de varios compuestos, los cuales deben ser separados para su mejor aprovechamiento (The American Petroleum Institute, 2001). Los compuestos separados son tan distintos que van desde gases de cuatro carbonos, hasta elementos muy sólidos. Uno de los compuestos mas utilizados es la gasolina, esta es líquida y debido a que contiene hidrocarburos de cuatro a doce carbonos, se constituye en un líquido fácilmente evaporable, estos gases pueden entrar al organismo por la vía respiratoria, alcanzar el torrente sanguíneo, llegar a los diferentes órganos y alterar el material genético, estas alteraciones pueden ser cromosómicas, génicas y genómicas.

Como estrategia de las multinacionales para la venta de combustibles se han diseñado lugares especiales para su distribución; las bombas de gasolina o estaciones de servicio. En estas estaciones trabajan personas en diferentes oficios, uno de estos son los vendedores de combustibles que constantemente están expuestos a los combustibles, porque ellos son las personas que los suministran al publico en general. Este trabajo lo hacen sin ninguna protección, no usan guantes para evitar la absorción por vía dérmica, ni caretas para evitar la inhalación por vía respiratoria. Por estas razones esta población está muy expuesta a los combustibles y en especial a la gasolina, la cual según reportes de la literatura contiene muchos compuestos como; Parafinas, Olefinas, Naftas, Aromáticos (The American Petroleum Institute, 2001), de los cuales él mas estudiado es el benceno, un hidrocarburo aromático. Asociación entre la exposición a hidrocarburos aromáticos y ciertos tipos de leucemias ha sido establecida por estudios epidemiológicos en varios países e industrias (Tompa *et al.*, 1994; IARC, 1982, 1987). El benceno se ha reportado como un modificador de la cromatina resultado que puede conducir a una leucemia, sus metabolitos interfieren con la topoisomerasa II y otras proteínas de la cromatina, (Marcon *et al.*, 2002).

En este estudio se utilizó la prueba de micronúcleos (MN) como un bioindicador directo de daño cromosómico (Hôsted, 1983). Los MN se originan de fragmentos de cromosomas o de cromosomas totales que no se incorporan en el núcleo de las células hijas. Estas anomalías de los cromosomas han sido causalmente relacionadas con el desarrollo de

cáncer, abortos, enfermedades genéticas entre otros (Rudd *et al.*, 1988; Duffaud *et al.*, 1997). Esta prueba se encuentra en proceso de validación, ya que la comunidad científica tiene gran aceptación por las ventajas que presenta; sensible porque responde a bajas concentraciones de diferentes sustancias, confiable porque es respaldada por varios estudios, económica porque se utilizan pocos reactivos y de fácil manejo (Fenech, 2000). Además, la prueba de MN registrada en células binucleadas, inducidas con Citocalacina-B, garantiza el registro de los MN en células que solo han pasado por un primer ciclo de división celular, en linfocitos humanos ha sido empleada por un gran número de laboratorios alrededor del mundo como un método sensible y revelante para identificar daño cromosómico, (Fenech y Morley, 1985).

Para este estudio se seleccionó un grupo 20 vendedores expuestos a los combustibles como mínimo por cinco años, todos no fumadores y otro grupo control de 20 individuos no expuestos. Se tomaron muestras de sangre periférica, previo consentimiento informado, se establecieron dos cultivos de 5 mL por individuo, incubados a 37 °C por 72 horas, cumplido 44 horas de incubación los cultivos se trataban con Citocalacina-B para obtener células binucleadas, finalmente se incubaban hasta completar las 72 horas para luego ser cosechadas. Las preparaciones citogenéticas fueron coloreadas con giemsa, se analizaron al microscopio 2000 células binucleadas por individuo y se registraron los MN en las tablas maestras, según criterios ya establecidos, (Fenech, 2003).

La población de vendedores de servicios esta en contacto permanente con los combustibles y algunos de los componentes de estos, como el benceno son genotóxicos y posiblemente producen daños en la información genética de estos individuos expuestos. Estudios epidemiológicos han mostrado que existe una relación entre la exposición al benceno y el aumento de la frecuencia de MN, (Yager, et al., 1990; Tompa, et al., 1994; Turkel y Egeli, 1994). Investigaciones realizadas a nivel mundial en trabajadores expuestos a los combustibles han mostrado aumentos significativos de daños citogenéticos, (Hôgstedt, et al., 1991; Santos-Mello y Cavalcante, 1992; Carere, et al., 1995; Bukvic, et al., 1998; Ayla, et al, 2003). Conocer la magnitud del daño precoz permite predecir el riesgo potencial en el que se encuentra la población expuesta de desarrollar problemas de salud como el cáncer, por la exposición ocupacional a combustibles. Los resultados de este estudio servirán para motivar a la reflexión sobre el autocuidado y la prevención de riesgos de salud, para una mejor calidad de vida.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto genotóxico de los combustibles en una población expuesta ocupacionalmente en la ciudad de Popayán. Con el propósito de motivar y sustentar la prevención a tiempo de los riesgos potenciales de problemas de salud por la exposición de las mezclas complejas de los combustibles, con practicas como el manejo y manipulación de los combustibles con implementos de protección.



## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial el uso de combustibles derivados del petróleo (gasolina, diesel, querosén y otros) es muy común; por encima de 1.3 millones de personas están expuestas ocupacionalmente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos que se encuentran en los combustibles, (Ritchie *et al.*, 2001). La población expuesta a la gasolina y el diesel de forma directa e indirecta involucra gran cantidad de individuos, dentro de las cuales la población con mayor exposición es la que habita en las ciudades.

Las bombas de gasolina o estaciones de servicio son lugares donde se lleva a cabo la distribución de combustibles para los usuarios. En estas estaciones trabajan personas en diferentes oficios como oficinistas, lavadores de carros, mecánicos, isleros entre otros. Los trabajadores más afectados son los isleros, también conocidos como bomberos o vendedores de servicios porque son quienes manipulan y distribuyen directamente el combustible sin tener protección que disminuya el contacto y la inhalación. El bajo nivel de escolaridad en algunos trabajadores, la deficiente cultura hacia la protección y la conciencia de la importancia que tiene la prevención para evitar problemas de salud en el lugar de trabajo, determinan un mayor riesgo para su salud. Además, estos individuos constituyen un sector vulnerable de la población debido a la frecuente exposición 8-9 horas diarias, (Jo y Song, 2001)

Los combustibles contienen sustancias que generan un riesgo para la salud de las personas, entre ellos encontramos a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, marcadores de combustibles y algunos metales pesados, los cuales pueden causar daño en las células tanto somáticas como germinales de las personas expuestas. Los combustibles son mezclas complejas de 150-260 alifáticos entre estos encontramos componentes neurotóxicos como el benceno, tolueno, xileno, naftaleno n-hexano etc. (Ritchie *et al.*, 2001). El benceno es clasificado como un carcinógeno humano y los vapores de la gasolina son clasificados como un posible carcinógeno para los humanos por contener este compuesto, (IARC, 1989). Los vendedores de servicios están expuestos a este compuesto por vía respiratoria y dérmica, (Machefer *et al.*, 1990; Lagorio *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 2002; Ayla *et al.*, 2003). Hasta el año 1992 los combustibles contenían plomo, este fue eliminado debido a sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Manual de Operaciones Mobil, 2000). Hay que recordar que varios de los individuos expuestos ya trabajaban desde antes en este oficio, por lo tanto, posiblemente estas personas presenten mayor número de daños genéticos.

En Popayán no existen estudios como este, que evalué los efectos genotóxicos por la exposición a los combustibles en la población de vendedores de servicios, aunque, existen estudios sobre los efectos tóxicos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales

pesados y otras sustancias presentes en los combustibles, en los cuales se alerta sobre el riesgo potencial de estos para generar problemas de salud como el cáncer y otras enfermedades de origen genético, como consecuencia de la capacidad que tienen estas sustancias de interactuar y alterar el material genético. El estudio de personas expuestas a combustibles es importante debido a que alerta sobre los efectos genotóxicos de los componentes que están interactuando con el material genético y la variabilidad en la respuesta biológica a la exposición ocupacional.

Se conocen datos de MN básicas normales en poblaciones diferentes a las de Colombia y con este estudio se puede ayudar a aumentar la base de datos de la frecuencia de MN en nuestra población, para que en un futuro se establezcan las frecuencias de micronúcleos en la población colombiana.

El principal objetivo del estudio fue realizar una evaluación del efecto genotóxico por exposición ocupacional a los combustibles, en linfocitos de sangre periférica, mediante la prueba de Micronúcleos (MN). La pregunta inicial fue: ¿La exposición a los combustibles, inducen a alteraciones cromosómicas en los vendedores de servicios, identificable por una mayor frecuencia de MN en los individuos expuestos?, ¿Existe una asociación de la frecuencia de MN (mayor o menor) con el tiempo (años) de exposición a los combustibles?.

## **2. HIPÓTESIS**

Si la mezcla química de los combustibles derivados del petróleo tiene efecto genotóxico en los vendedores de combustibles en las estaciones de servicio de la ciudad de Popayán, se espera que en los linfocitos de sangre periférica, cultivados *In vitro*, se cuantifique una mayor frecuencia de micronúcleos, que en los linfocitos de las personas que no están expuestas a los combustibles pero con características demográficas similares.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La exposición a la mayoría de agentes mutagénicos y carcinogénicos ocurre en el lugar de trabajo (Tomatis, 1988). Aproximadamente el 5%-15% de las muertes por cáncer en hombres y el 1%-5% de muertes por cáncer en mujeres, pueden ser atribuidas a factores ocupacionales (Doll y Peto, 1981). Es de gran interés para la comunidad científica internacional conocer los riesgos potenciales de salud por la exposición ocupacional. En 1700, el padre de la medicina ocupacional, Bernardino Ramazzini describió algunas enfermedades ocupacionales. El primer caso de cáncer causado por la exposición ocupacional fué identificado por Percival Pott (1775), quien identificó al hollín como la causa de cáncer de escroto en limpiadores de chimeneas en Londres.

En países subdesarrollados y especialmente en Latinoamérica, esta problemática es mucho mayor porque existen muchos factores de riesgo a los cuales están expuestos los trabajadores por pertenecer al sector no formal de la industria, por la falta de control de la exposición a agentes tóxicos prohibidos en países desarrollados, por el bajo nivel de escolaridad en algunos trabajadores, por la falta de educación, por la deficiente cultura de la prevención y la higiene industrial y por el no uso de medidas de protección a agentes carcinogénicos.

Por esta razón es una prioridad detectar e identificar los agentes genotóxicos en los lugares de trabajo y hacer estudios de monitoreo biológico (genético), para identificar a tiempo efectos precoces empleando biomarcadores que ayuden a identificar poblaciones en riesgo de desarrollar problemas de salud por la exposición ocupacional con el propósito de implementar medidas que ayuden a proteger de la exposición y a establecer programas de vigilancia epidemiológica que permitan la prevención de enfermedades y la promoción de la salud. Se sabe que sustancias químicas o físicas afectan o interactúan de forma directa o indirecta con el ADN, ocasionándole daños que pueden ser reparados o que de lo contrario pueden fijarse dentro de éste, en forma de mutación, trayendo como consecuencia problemas secundarios y colaterales de salud como es el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Una gran variedad de químicos han sido identificados como genotóxicos en animales experimentales y en humanos expuestos ocupacionalmente, por su estilo de vida o por la contaminación ambiental. (Heddle *et al.*, 1978).

Los combustibles productos derivados del petróleo, son mezclas complejas de muchos compuestos químicos; entre ellos alifáticos, parafinas, oleofinas, aromáticos (el benceno y compuestos similares al benceno), hidrocarburos de petróleo. Además, ellos pueden contener pequeñas cantidades de nitrógeno, azufre, y otros elementos como aditivos. La composición química (p. Ej., el porcentaje exacto de cada componente) de cada uno de los

combustibles puede variar, dependiendo de la fuente y de otros factores. Los combustibles son distinguidos el uno del otro principalmente por sus gamas de punto de ebullición, aditivos químicos, y empleos. De los compuestos el más estudiado es el benceno, un hidrocarburo aromático. El benceno se ha reportado como un carcinógeno humano, efecto que puede ser la causa de una leucemia, (Marcon *et al.*, 2002) y los vapores de la gasolina como un posible carcinógeno por tener este compuesto, (IARC, 1989). Estudios epidemiológicos han mostrado que existe una relación entre la exposición al benceno y el aumento de la frecuencia de MN, (Tomba *et al.*, 1994; Turkel y Egeli, 1994).

La venta de los combustibles se realiza en las estaciones de servicio y son suministrados por los vendedores de servicios, ellos venden el combustible sin utilizar ninguna protección para evitar la exposición a estos. La importancia de realizar un estudio como este, radica en que los componentes de los combustibles que son un mezcla muy compleja posiblemente producirán daños en el material genético, por lo cual conocer la magnitud del daño nos dará una alerta temprana para predecir el riesgo potencial en el que se encuentra la población de desarrollar problemas de salud como el cáncer, por la exposición ocupacional a combustibles. Los resultados de este estudio servirán para motivar a la reflexión sobre el autocuidado y la prevención de riesgos de salud, para una mejor calidad de vida.

Luego de hacer una amplia revisión bibliográfica en bases de datos como Medline y registrar que son pocas las investigaciones que tienen como objeto de estudio la evaluación genotóxica por la exposición ocupacional a los combustibles empleando biomarcadores citogenéticos de efecto como los micronúcleos, se encontró que estudios realizados a nivel mundial en trabajadores expuestos a los combustibles han mostrado aumentos significativos de daños citogenéticos, (Hôgstedt *et al.*, 1991; Santos-Mello y Cavalcante, 1992; Carere *et al.*, 1995; Bukvic *et al.*, 1998; Ayla *et al.*, 2003).

Las pruebas citogenéticas, como la empleada en este estudio son importantes porque permiten evaluar efectos citotóxicos y genotóxicos en los individuos expuestos a mutágenos y carcinógenos (Au, 1991). Una alteración cromosómica puede constituirse en el inicio del proceso de la carcinogénesis. Estudios realizados en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos han mostrado daños en sus cromosomas dando un pronóstico anticipado de posible riesgo de desarrollar cáncer, (Bonasi *et al.*, 1995; Hagmar *et al.*, 1994). La técnica de micronúcleos en células binucleadas de linfocitos humanos, es útil para evaluar diferentes compuestos químicos y agentes físicos potencialmente genotóxicos. Un monitoreo debe cumplir con: pequeñas muestras de sangre, amplio espectro de daño genómico, ensayo de bajo costo, simple y fácil de ejecutar, y una prueba acertada para comparar poblaciones. La prueba de micronúcleos, satisface todos estos requerimientos (Feillay y Orsiere, 2.000). Además esta técnica bien estandarizada en nuestro laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto genotóxico por la exposición ocupacional de los combustibles en vendedores de servicios de la ciudad de Popayán, mediante el empleo de la prueba de micronúcleos (MN).

Con el propósito de motivar y sustentar la prevención a tiempo de los riesgos potenciales de problemas de salud por la exposición de las mezclas complejas de los combustibles y que los vendedores de servicio vean la importancia de tener medidas preventivas para el manejo y manipulación de los combustibles, para de esta manera reducir los riesgos de salud y mejorar su calidad de vida.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Relacionar la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica de vendedores de combustibles en estaciones de servicio con respecto al grupo control.

Relacionar la frecuencia de micronúcleos (MN) en el grupo expuesto con relación al tiempo de exposición a los combustibles.

Asociar la frecuencia de micronúcleos (MN) en el grupo expuesto con relación a su edad.

## 5. ANTECEDENTES

La prueba de micronúcleos se ha empleado desde 1959 (Evans, *et al*, 1977), quienes utilizaron la frecuencia de micronúcleos para medir el daño citogenético inducido en los meristemas de raíces por efecto de rayos x y en ausencia y presencia de oxígeno, desde entonces ha sido considerada como biomarcador de efecto citogenético. Posteriormente en 1966-1970 Schroder, empleó medula ósea para determinar el daño *in vivo* que podían causar algunos mutágenos y relacionar el daño citogenético con el origen de micronúcleos en células de medula ósea. De aquí en adelante se ha venido empleo mucho esta prueba para evaluar el efecto genotóxico de diferentes compuestos químicos.

Fredga *et al*; (1982), estudió la incidencia de los cambios cromosómicos en los trabajadores expuestos ocasionalmente a combustibles de automóviles y a los escapes de gases. Utilizó cuatro grupos de individuos cada uno de 12 trabajadores (conductor de camiones de motor diesel, conductores de camiones de motor a gasolina, inspectores de automóviles, y un grupo de referencia). Los hombres en los grupos fueron emparejados de acuerdo a la edad a los hábitos (fumar) y al tiempo que llevaban en su trabajo. Las pruebas utilizadas fueron alteraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH). El análisis estadístico de los resultados no dio ninguna prueba de que la exposición estuviera causando algún efecto en los cromosomas, aunque dejó una sospecha grande de que la exposición a los gases de motores diesel pueden causar un aumento en el número de alteraciones cromosómicas.

Foo, en 1991, realizó un estudio para determinar los rangos del benceno en la gasolina y encontró este compuesto en un rango de 1.8 a 3.7%. Además se encontró que los vendedores de combustibles están expuestos a unos niveles de 0.064-179 ppm. En su tiempo de trabajo diario (8 horas) la exposición tiene un promedio de 0.028 a 0.71 ppm. En mecánicos de servicio de automóvil, el nivel de exposición es 0.014 a 1.7 ppm. En conductores de camiones transportadores de gasolina es 0.08 a 2.37 ppm. y para las personas no expuestas ocupacionalmente a la gasolina, es de 0.0023 a 0.027 ppm.

Santos-Mello y Cavalcante. (1992), realizaron un estudio citogenético en una población de gasolineros, el grupo de expuestos fue de 49 individuos y el grupo control de 24. El análisis mostró una frecuencia alta de alteraciones cromosómicas en el grupo expuesto contrario al registrado en el grupo control. Teniendo en cuenta la relación entre la toxicidad y el riesgo de cáncer, podemos considerar a estos trabajadores como un grupo de alto riesgo.

Lagorio *et al.*, (1994), La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó los vapores de la gasolina y los gases de escape de los automóviles abastecidos de combustible como cancerígenos para los humanos. Los datos sobre la composición química exacta de gasolina y sobre todo la concentración del benceno, son bastante pobres, por esta razón ellos realizaron esta investigación para evaluar el nivel anual de la exposición a hidrocarburos aromáticos en la gasolina vendida por los gasolineros, las muestras de gasolina también fueron recogidas para determinar el contenido de benceno en la gasolina, y evaluar la variabilidad de la concentración del benceno en varias gasolinas según la estación del año. La exposición de benceno fue medida por cromatografía de gases en muestras de aire obtenidas con bombas personales en la zona que respiraban. Asociaciones estadísticamente significativas fueron encontradas entre la exposición individual al benceno y la cantidad de gasolina vendida.

Wong *et al.*, 1993, realizaron un estudio de cohorte entre los años de 1946 y 1985, con 18,135 trabajadores expuestos a la gasolina que llevaba por lo menos un año de exposición. El objetivo principal del estudio fue determinar la relación, entre la exposición a la gasolina y mortalidad por cáncer de riñón o leucemia. Los resultados de este estudio indicaron que no hubo incremento en la mortalidad por cáncer de riñón o leucemia causados por la exposición a la gasolina comparados con la población general.

Carere *et al.*, (1995). En este estudio, se vio la posible relación entre la exposición ocupacional a combustibles de petróleo y daños citogenéticos en linfocitos de sangre periférica. Fueron escogidos 23 trabajadores (hombres), no fumadores del área de Roma, y 23 controles sin la exposición ocupacional a los combustibles, fueron apareados por edad y hábitos. Se realizaron las pruebas de (AC), (ICH), (MN). El análisis mostró un ligero aumento en AC e ICH. 1.97 contra 1.46 AC/100 células, y 4.73 +/-0.15 contra 4.48 +/-0.11 ICH/células. En individuos expuestos y en los controles respectivamente. Finalmente, el análisis de MN no mostró aumento significativo en la frecuencia de MN de los trabajadores expuestos.

En 1996, Pitarque *et al.* Determinó que los gasolineros o vendedores de servicios de las estaciones de servicio son los trabajadores que definitivamente están más expuestos a las mezclas complejas de los combustibles y se cree que esta exposición puede causar efectos genotóxicos, para este estudio se escogió un grupo de 50 trabajadores de las estaciones de servicio y 43 controles que no estuvieran expuestos a combustibles. Se aplicó la prueba de micronúcleos (MN). Los resultados obtenidos no indican ninguna diferencia significativa de MN entre el grupo expuesto y el grupo control.



Nilsson *et al.*, (1996), para estudiar los efectos genotóxicos de la exposición a niveles bajos de benceno, fueron escogidos 33 hombres ocupacionalmente expuestos al benceno de la gasolina y 33 controles. Los trabajadores expuestos tenían un aumento significativo en niveles de benceno comparado con los controles. Esto indica que la exposición al benceno se da en niveles relativamente bajos, es decir aproximadamente 0.1 ppm (0.3 mg/m<sup>3</sup>).

Bolognesi *et al.*, 1997. La contaminación atmosférica representa un riesgo medioambiental pertinente que ha sido asociado con el exceso de mortalidad, morbilidad, y con el aumento de enfermedades respiratorias en humanos. Más de 3,000 compuestos químicos se han identificado en el ambiente, entre los cuales se encuentran mutagénicos y/o carcinogénicos, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Asociaciones positivas entre biomarcadores citogenéticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos han sido reportadas en estudios experimentales y en humanos. Un estudio de biomonitoring genético se realizó en 82 policías de tráfico expuestos a la contaminación atmosférica y en 34 controles. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos citogenéticos, tales como la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, y estimar la exposición individual a hidrocarburos aromáticos policíclicos. El análisis estadístico de la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas mostró niveles altos en el grupo control (4.03%) respecto a los policías de tráfico (3.73%). El estudio falló para detectar alguna asociación entre frecuencia de micronúcleos y niveles de Benzo(a)pireno, considerado un marcador de exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Lynge *et al.*, 1997, estudiaron la incidencia de cáncer en una cohorte de 19,000 trabajadores de estaciones de servicio de Dinamarca, Noruega, Suecia, y Finlandia. El estudio empezó en 1970 y duró 20 años. Donde se observaron 1,300 casos de cánceres, se usaron las tasas de incidencias de cáncer nacionales para la comparación. La incidencia no se incrementó para la leucemia. Hubo un ligero aumento para el cáncer del riñón y para el cáncer faríngeo, laríngeo, y pulmonar. Esta cohorte expuesta a los vapores de gasolina con niveles de benceno estimados en 0.5 -1 mg/m<sup>3</sup>.

Pitarque *et al.*, (1997), investigó que derivados del petróleo constituyen una mezcla compleja de sustancias químicas que pueden causar efectos genotóxicos. La exposición crónica ocupacional a tales derivados, se puede considerar riesgosa para la salud. Los asistentes de estación de servicio son trabajadores expuestos a derivados de petróleo. En este estudio se utilizaron las pruebas de ICH y el índice de proliferación celular (IP), se escogió un grupo de 42 trabajadores expuestos y un grupo de 45 controles. Los resultados obtenidos indican que no hay ninguna diferencia significativa en los valores de ICH, entre los trabajadores expuestos y el grupo control. El IP registró un aumento ligero pero no estadísticamente significativo.

En 1997, Periago *et al.* Definió que el volumen de gasolina vendida, puede aumentar considerablemente los niveles ambientales de los vapores de hidrocarburos aromáticos y posteriormente, el riesgo ocupacional de los gasolineros de las estaciones de servicio, sobre todo en el caso del benceno. En este estudio se evaluó la exposición ocupacional a hidrocarburos aromáticos mediante muestras de vapores de gasolina en una población de gasolineros de la estación de servicio. Esta evaluación fue realizada usando dechados difusivos, en dos épocas del año muy diferentes (marzo y julio). Una relación significativa entre el volumen de gasolina vendida durante cada turno y la concentración ambiental de benceno, tolueno, y xilenos fue encontrada para cada trabajador. Además una diferencia significativa fue encontrada entre la concentración media de compuestos aromáticos en marzo que presentaba una temperatura ambiental de 14-15°C y julio que presentó una temperatura de 28-30°C. Además, el 20 % de la población evaluada fue expuesto a una concentración por encima del valor límite de 960 mg/ms propuesta por la Conferencia americana de Higienistas Gubernamentales Industriales (ACGIH).

Bukvic *et al.*, (1998), realizaron un estudio utilizando ICH y MN. Fueron escogidos 22 hombres con exposición baja media (229 mg/m<sup>3</sup> = 0.72 ppm) al benceno y 19 hombres de control para ICH, 21 expuesto, 19 controles para la prueba de MN. El grupo expuesto fue escogido de 10 gasolineras diferentes en o cerca de la ciudad (Bari/South Italia). El resultado no mostró ninguna significancia para la prueba de ICH. La frecuencia de MN aumentó en relación con el tiempo del empleo.

Carere *et al* (1998), aplicaron métodos moleculares citogenéticos para investigar el efecto de la exposición ocupacional a las concentraciones bajas de benceno y combustibles de petróleo sobre la estabilidad genómica. Para este estudio seleccionaron 12 hombres de estaciones de gasolina (la exposición de benceno media de 0.32 mg/m<sup>3</sup>) y 12 controles. La incidencia de hiperploidía y poliploidía en linfocitos de sangre periférica fue evaluada por hibridación *in situ* de las células en interfase. La incidencia de la pérdida de cromosomas fue determinada en células bloqueadas en citocinesis utilizando la prueba de micronúcleos. Los resultados obtenidos no mostraron ningún aumento relacionado con la formación de micronúcleos o hiperploidía.

En 1999, Lemasters *et al.* Realizaron una investigación con objetivo doble. El primero debía determinar el medio óptimo para medir la dosis interna de solventes y que se pudieran comparar en sangre, orina y el aliento. El segundo debía determinar si exposiciones bajas eran asociadas con cambios genotóxicos, después de una exposición a corto plazo de quince o treinta semanas. Para lograr el primer objetivo se realizó un estudio piloto, con ocho voluntarios que trabajaron en el mantenimiento de aviones; en segundo objetivo se escogieron 58 trabajadores del mantenimiento de aviones, fueron supervisados antes de la exposición y más de 30 semanas para determinar si había cambios genotóxicos,

como consecuencia de la exposición a solvente y/o de combustible esto fue evaluado mediante ICH y (MN). Los resultados muestran un aumento pequeño pero estadísticamente significativo de la frecuencia de ICH después de 30 semanas de exposición. La frecuencia de MN en los trabajadores al principio mostró un aumento significativo antes de 15 semanas, pero antes de 30 semanas se había disminuido.

Maranelli *et al.*, (2000), Las regulaciones europeas clasifican la gasolina como un agente "carcinogénico debido a que esta contiene benceno (> 0.1%). Por consiguiente la prevención y promoción hacia los vendedores de servicio prescriben, la eliminación del agente o la reducción de la exposición. Los niveles de exposición en las estaciones de servicio, pueden ser influenciadas por una variedad de factores, diferentes al benceno, razón por la cual el biomonitoreo biológico puede ser una ventaja frente al monitoreo ambiental. Datos Toxicológicos y epidemiológicos, sugieren hacer un programa de vigilancia epidemiológica para la población activa, supervisando con exámenes clínicos, integrado con pruebas hematológicas y con pruebas de biomonitoreo biológico, estas deben llevarse a cabo en aspirantes al empleo y repetirse anualmente.

Jo y Song (2001), encuentra que las personas que trabajan cerca de fuente(s) de compuestos volátiles orgánicos, como en automóviles, emisiones de vapor de gasolina, son sospechosos de estar expuestos a niveles elevados de compuestos volátiles orgánicos durante su tiempo de trabajo. Este estudio confirmó esta sospecha, fueron evaluados policías de tránsito, personas que trabajaban en parqueaderos, vendedores de combustibles, tenderos del borde de la carretera y tenderos subterráneos, midiendo diferentes concentraciones de compuestos volátiles orgánicos; en el aire, en lugar de trabajo, el aire personal y muestras de aliento. Las concentraciones de aliento de post-trabajo de los trabajadores eran ligeramente o considerablemente más altas que las concentraciones de aliento de pre-trabajo, dependiendo (según) el compuesto y la ocupación. Además, ambos el pre y las concentraciones de aliento de post-trabajo de los trabajadores mostraron niveles elevados comparados con un grupo de control de estudiantes de colegio.

En el año de 2001 el Instituto americano de petróleo (The American Petroleum Institute) envió a la US EPA un reporte donde realizaron varios estudios entre ellos genotóxicos *in Vitro e in Vivo* para los componentes de la gasolina (parafinas, oleofinas, naftalenos y aromáticos). Los estudios *in vitro* se realizaron con y sin activación metabólica. Los resultados arrojaron que solo los compuestos aromáticos con activación metabólica muestran efectos mutagénicos positivos y los *in vivo* se realizaron en roedores para los mismos compuestos, pero en ninguno de ellos reveló efecto alguno.

Marcon *et al* (2002), realizaron un estudio para evaluar los efectos genotóxicos de la exposición a combustibles derivados del petróleo y a niveles bajos de benceno, en linfocitos de sangre periférica, en 12 vendedores de combustibles. La técnica utilizada fue FISH; se marcaron las regiones contiguas 1cen-1q12 del cromosoma 1 permitiendo la detección simultánea de hiperploidia y quiebres en células en interfase y metafase. Las células en interfase mostraron diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) en linfocitos estimulados ( $9.9 \pm 3.3$  y  $6.5 \pm 1.5$  por 1000 en expuestos y controles respectivamente). Menos incidencia de quiebres fue detectada en células metafásicas ( $0.3 \pm 0.8$  vs  $0.7 \pm 1.0$  por 1000 respectivamente). El análisis de células post-mitóticas bloqueadas en citocinesis mostraron una incidencia significativamente alta de núcleos con desplazamiento de señales fluorescentes ( $7.2 \pm 2.4$  y  $5.6 \pm 1.7$  por 1000 respectivamente). Sugiriendo que la condensación de la cromatina, más que una alteración de la integridad de la cadena de ADN, guía a una separación de señal en núcleos en interfase. Aunque el mecanismo que guía a la separación de satélites  $\alpha$  y clásicos en núcleos en interfase no han sido elucidados, la asociación significativa entre resultados citogenéticos y la intensidad de exposición a el benceno sugieren que el desplazamiento de señal de 1cen-1q12 puede ser un marcador de exposición química.

Jia *et al* 2002. Estudiaron los efectos adversos que podía causar la gasolina en la piel, en un grupo de 52 trabajadores expuestos y 52 controles. Se obtuvieron muestras de ceramida, ácido graso y colesterol porque los lípidos juegan un papel predominante en el manteniendo de la función fisiológica de la piel, estos fueron coleccionados de las manos de los individuos y analizados por cromatografía de capa fina de alta resolución. Los resultados mostraron que los trabajadores expuestos presentan mayor hiperqueratosis, resequedad y dermatitis que el grupo control, esto indica que la prolongada exposición a la gasolina o el contacto repetido puede causar fisuras en la piel y daños en las uñas.

Muzyka *et al.*, 2002. Trabajadores que distribuyen diesel están intensivamente expuestos a los vapores de este combustible. El diesel presenta la principal fuente de polución atmosférica por contener benceno. Los niveles de benceno son usados para evaluar la exposición al combustible diesel. El benceno causa alteraciones en el metabolismo de la porfirina y algunas de estas alteraciones pueden llevar a la generación de tumores. Un estudio realizado en un grupo de 20 trabajadores expuestos al combustible diesel y 20 personas no expuestas fueron examinadas mediante espectrofotometría en linfocitos, encontrando los niveles de ácido 5-aminolebulinico y protoporfirina más altos en el grupo expuesto que el grupo control.

Leopardi *et al.* 2003. La prueba de micronúcleos utilizando Citocalacina-B en linfocitos de sangre periférico, fue usada para evaluar los efectos genéticos de la exposición ocupacional

en policías de tráfico en Roma. El grupo de estudio consistió en 134 policías y 58 controles. Los grupos fueron apareados por edad, género y hábitos de fumar. El promedio de exposición al benceno durante su turno de trabajo fue de 9.5 y 3.8  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en los individuos expuestos y controles, respectivamente. El número de micronúcleos fue registrado en 1000 células binucleadas. El análisis de regresión lineal mostró que la frecuencia de MN era principalmente modulada por la edad ( $P = 0.001$ ) y el género ( $P = 0.001$ ) de los individuos del estudio, (relativamente superior en el anciano y mujeres), sin embargo esto no fue afectado por la exposición ocupacional a la polución atmosférica y hábitos de fumar.

Ayla Celik, *et al* (2003), estudiaron los efectos de la exposición ocupacional al petróleo y sus derivados como el benceno, en células bucales exfoliadas de 50 asistentes de gasolinera y 50 controles, emparejado por sexo, edad y hábitos. Fueron examinados mediante la prueba de MN. La exposición de benceno fue averiguada midiendo niveles de fenol urinarios. El nivel de fenol urinario de trabajadores de la estación fue considerablemente más alto que el del grupo control ( $P < 0.05$ ). El análisis de células bucales reveló que la frecuencia de MN en trabajadores de gasolinera eran considerablemente más altos que en el control ( $P < 0.01$ ). Esto indica que los trabajadores de gasolinera están en un riesgo de daño citogenético significativo.

Ayla Celik y Etem (2003), los derivados del petróleo constituyen una mezcla compleja de químicos los cuales son conocidos como genotóxicos, ejemplo el benceno. La exposición ocupacional crónica a estos derivados pueden ser considerados como riesgos genotóxicos. En este estudio se empleo la prueba de ICH y AC y fue evaluada en linfocitos de sangre periférica de 30 trabajadores expuestos a combustibles (15 fumadores y 15 no fumadores) y en 30 controles (15 fumadores y 15 no fumadores). Se encontró una diferencia significativa entre la exposición y los ICH y AC. No se encontró diferencia significativa entre fumar e incremento de ICH y AC.

Periago y Prado, 2005, Durante el tanqueo, las personas pueden estar fácilmente expuestas a niveles sumamente altos de vapores de gasolina durante un tiempo corto, aunque tal exposición toma más importancia en el caso de los vendedores de combustibles. La cantidad de gasolina vendida en las operaciones de tanqueo y la temperatura ambiental puede aumentar significativamente los niveles de vapores ambientales de benceno, tolueno y xileno (BTXs) y subsecuentemente, el riesgo ocupacional de vendedores de combustibles. Esto es especialmente importante para el caso del benceno, el componente más importante de los vapores de gasolina. En este estudio, se analizaron las diferencias encontradas entre los niveles de concentración aérea de BTXs entre 2000 y 2003, este se realizó en dos fases. La primera fase se llevó a cabo en el 2000, después de la aplicación de la nueva regulación legal que limita la concentración del benceno en la gasolina. En un grupo de 28 trabajadores expuestos ocupacionalmente, con una temperatura ambiente de 30

a 31°C. La segunda fase, se seleccionaron 19 individuos expuestos, las muestras se tomaron en julio del 2003, uno de los meses más calurosos, con una temperatura de 35-36°C. Los resultados se compararon con un estudio realizado en 1995, con similares temperaturas ambientales. Una relación significativa entre la cantidad de gasolina vendida y la concentración ambiental de hidrocarburos aromáticos, fue encontrada para cada trabajador muestreado en los tres años. Además, se observó una disminución significativa en los niveles ambientales de BTXs después de enero del 2000, sobre todo en el caso del benceno, con una concentración promedio para las 8 horas de 736  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  con un rango (272-1603) en 1995, 241  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  con un rango (115-453) en 2000 y 163  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  rango (36-564) en 2003.

## **6. MARCO TEÓRICO**

### **6.1 ¿QUÉ SON LOS COMBUSTIBLES?**

Los combustibles vienen del petróleo ordinario y son refinados, estos son mezclas de alifáticos, hidrocarburos aromáticos como (benceno y compuestos similares a él), hidrocarburos de petróleo y pequeñas cantidades de nitrógeno, azufre, y otros elementos como aditivos. La composición química; el porcentaje exacto de cada componente de cada uno de los combustibles puede variar algo, dependiendo de la fuente y de otros factores. Los combustibles son distinguidos el uno al otro principalmente por sus gamas de punto de ebullición, aditivos químicos, y empleos, son usados en muchos tipos de motores, lámparas, calentadores, hornos, estufas, y como solventes. (ATSDR, 1995)

### **6.2 COMBUSTIBLES DEL PETRÓLEO**

El petróleo es uno de los combustibles más usados en la actualidad. Sin embargo, para su formación requirió millones de años. Hace 6.000 años los asirios y babilonios lo usaban para pegar ladrillos y piedras; los egipcios, para engrasar pieles; y tribus precolombinas de México pintaron esculturas con él. En 1859 Edwin L. Drake perforó el primer pozo de petróleo, cerca de Titusville, en Pensilvania, quedándose ésta como la fecha del "descubrimiento" del petróleo.

El petróleo es un recurso natural no renovable, y actualmente también la principal fuente de energía, es un compuesto de origen orgánico, más denso que el agua y de un olor fuerte y característico. La composición media del petróleo sería 85%C, 12%H y 3% S+O+N, además de varios elementos metálicos. La composición de los crudos varía dependiendo del lugar donde se han formado. Las diferencias entre unos y otros se deben, a las distintas proporciones de las diferentes fracciones de hidrocarburos, y a la variación en la concentración de azufre, nitrógeno y metales. Su probable origen está en las acumulaciones enormes de pequeños seres vegetales microscópicos llamados diatomeas. Estos animales tienen en su interior una gota de lípidos que las bacterias descompondrán, junto a sus proteínas y glúcidos. Al llevarse a cabo este proceso en las especiales condiciones (alta presión) durante millones de años, la descomposición avanza en una forma tremendamente lenta y paciente hasta conseguir una sustancia negra y oleosa: el petróleo. Se extrae de la superficie terrestre y después es almacenado en grandes depósitos y enviado mediante oleoductos (vía terrestre) o por los grandes barcos petrolíferos (vía marítima) hasta los depósitos de almacenamiento de las refinerías. En numerosas ocasiones se utiliza la palabra crudo, para denominar al petróleo sin refinar. En las refinerías el crudo pasa a convertirse en un derivado del petróleo. El proceso de refinado pretende: separar el crudo en fracciones diferentes mediante destilación fraccionada o fraccionamiento del crudo, convertir las fracciones que tienen una menor demanda en el mercado en otras de

mayor demanda. Esto se realiza gracias a la técnica de ruptura térmica o catalítica (craqueo).

### 6.3 COMBUSTIBLES DISTRIBUIDOS EN ESTACIONES DE SERVICIO DE LA CIUDAD DE POPAYÁN

**Figura 1. Estación de servicio de la ciudad de Popayán**



Encontramos la gasolina corriente y extra, el diesel corriente (ACPM) y diesel Premium. En nuestro estudio nos interesa conocer un poco más sobre ellos, porque son los combustibles a los cuales la población objeto de estudio esta expuesta constantemente.

**6.3.1 La gasolina.** Es una mezcla compleja donde puede haber de 200 a 300 hidrocarburos distintos, formada por fracciones de combustibles provenientes de diferentes procesos de la refinación del petróleo, tales como destilación atmosférica, ruptura catalítica, ruptura térmica, alquilación, reformado catalítico, polimerización, y otros.

La gasolina contiene más de 150 productos químicos, su mezcla alcanos de cuatro a doce carbonos, parafinas, isoparafinas, naftalenos y compuestos aromáticos (principalmente el benceno, tolueno, etilbenceno, y xileno). A partir de 1992 el plomo fue eliminado de la gasolina. La composición de la gasolina es indicada en porcentajes de los componentes: 11.4% n-parafinas, 46.5% isoparafinas, 4.7% cicloparafinas, 9.0% mono-olefinas, 28.4% aromático (Domask, 1984). El instituto americano de petróleo en un estudio dirigido por el MacFarly, *et al.*, (1984) utilizó la misma composición usado por Domask (1984), pero el benceno de esta mezcla se especificó como 1.69%. La más reciente mezcla de gasolina, contiene un porcentaje mayor de aromático (33.2%) y olefinas (12.5%) y un más bajo



porcentaje de hidrocarburos saturados (Styeven y Goldsworthy, 1993). Hay que tener en cuenta que la manera como se manufactura la gasolina determina las sustancias químicas y el porcentaje de esta. La composición efectiva varía con la fuente del petróleo crudo, el fabricante y la época del año. La gasolina presenta una densidad comprendida entre 0,70 y 0,78 Kg./litro; y un punto de ebullición entre 40°C - 180°C (Mehlman, 1990), y su combustión produce monóxido de carbono (CO), hidrocarburos (HC), óxidos de nitrógenos (NOx), y otros componentes tóxicos como el benceno. La combustión de gasolina sin postratamiento del gas de escape lleva a mayores emisiones de hidrocarburos (incluyendo el benceno) y mayor cantidad de monóxido de carbono

La gasolina presenta una mezcla de heptano (detonante) e isoctano (antidetante), cuya proporción de éste último indica el índice de octano, o índice de resistencia a la detonación, necesario para los motores de gasolina. Para reforzar el carácter antidetonante de las gasolinas se empleaba el compuesto químico tetraetilo de plomo; este era casi totalmente emitido en el gas de escape y debido a su alta toxicidad en los humanos, generaba daños en el sistema nervioso durante el proceso embrionario. Actualmente la gasolina se fabrica sin este componente, para sustituirlo se emplea compuestos químicos bencénicos, de ciclo cerrado, con gran poder antidetonante, como el metil t-butil éter, que no contiene plomo. (ATSDR, 1995)

La mezcla final de la gasolina corriente tiene un Índice de Octano de 81 como mínimo y la gasolina extra tiene un índice de 87 como mínimo. El Índice Octano es una medida de la capacidad antidetonante de la gasolina y la principal característica que identifica el comportamiento en la combustión dentro del motor. Mayor Octanaje indica mejor calidad. Antes de ser distribuida a las estaciones de servicio, se le adicionan aditivos detergentes dispersantes con el fin de prevenir la formación de depósitos en todo el sistema de admisión de combustible (carburadores, inyectores de combustible, lumbreras o puertos de entrada y asientos de las válvulas de admisión de los motores).

La gasolina es comúnmente usado en vehículos carreteros, estufas, motosierras y guarañas. Se clasifica como un líquido inflamable clase 1A de acuerdo con la Norma 321 de la NFPA ( National Fire Protection Association), por lo cual debe tenerse especial cuidado cuando se diseñen plantas de almacenamiento, estaciones de servicio, o cualquier otra instalación para su manejo y deben aplicarse las normas NFPA para la protección contra el incendio, las Normas API (American Petroleum Institute) y las reglamentaciones expedidas por las autoridades gubernamentales de control tanto nacional como regional y local. Este producto es volátil, genera vapores desde una temperatura de -43°C, los cuales al mezclarse en proporciones de 1.1 a 7.6% en volumen producen mezclas inflamables y explosivas. ([http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/gasolina\\_corriente.htm](http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/gasolina_corriente.htm)).

Por ningún motivo se debe almacenar gasolina en la casa, apartamento o en cualquier recinto cerrado. El combustible se evapora continuamente y, además de generar una atmósfera de vapores tóxicos, puede causar un incendio o una explosión. Y al ser altamente volátil, permite que nos exponamos muy fácilmente, pues la ruta de exposición más común es la vía respiratoria, cuando respiramos los vapores en las estaciones de servicio, cuando vamos a llenar el tanque de los automóviles, pero están mayormente expuestas las personas que suministran los combustibles (vendedores de servicios), ellos inhalan el combustible permanentemente mientras trabajan y en muchas ocasiones también están expuesto por vía dérmica. Debe evitarse el contacto con la piel y la inhalación de vapores debido a que estos son tóxicos y en concentraciones altas pueden causar mareos, pérdida del conocimiento y, en casos extremos, hasta la muerte.

([http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/gasolina\\_corriente.htm](http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/gasolina_corriente.htm)).

Son muchos los efectos tóxicos que se han vistos después de la exposición a la gasolina. Inhalar o beber grandes cantidades. Los niveles de gasolina que mata a las personas son aproximadamente 10,000-20,000 ppm cuando se respira y aproximadamente 12 onzas cuando se bebe. Las concentraciones altas de gasolina irritan los pulmones, al estómago y la piel. Respirando altos niveles de gasolina en periodos cortos de tiempo o beber grandes cantidades también pueden causar efectos dañinos en el sistema nervioso. Los efectos del sistema nervioso menos serios incluyen vértigo y dolores de cabeza, mientras los efectos más serios incluyen coma y la incapacidad para respirar. Algunos animales del laboratorio que respiraron concentraciones altas de vapores de gasolina sin plomo continuamente por 2 años desarrollaron tumores en el hígado y en el riñón (MacFarly *et al.*, 1984). No hay ninguna evidencia sin embargo, de que la exposición a la gasolina causa cáncer en los humanos. Algunos informes de inhalación accidental o intencional de vapores de gasolina que producen la muerte se han publicado (Boeckx, *et al.*, 1977; Poklis, 1976). Los motores de gasolina son la causa principal de los contaminantes tóxicos para el aire tales como la bencina y el butadieno, los cuales son conocidos causantes de cáncer en los humanos, y del formaldehído y de la creolina, conocidos como irritantes del sistema respiratorio.

(<http://www.nrdc.org/greengate/espanol/air/dieself.asp>).

**6.3.2 El diesel.** O aceite combustible para motores (ACPM), es un destilado medio obtenido de la destilación atmosférica del petróleo crudo. Contiene una mezcla compleja de hidrocarburos, compuesto principalmente de parafinas y aromáticos, con un contenido de oleofina que alcanza solamente a un pequeño porcentaje por volumen. Su calidad de ignición se caracteriza por el índice de Cetano o el Número de Cetano. El primero es calculado a partir de algunas propiedades de destilación y debe ser de 45 como mínimo; el segundo resulta más preciso porque es medido en un motor bajo unas condiciones estándar. El diesel es líquido claro de aspecto tornasolado, su punto de inflamación es  $>55^{\circ}\text{C}$  ( $133^{\circ}\text{F}$ ) y su punto de ebullición es de  $390^{\circ}\text{C}$ . Se clasifica como un líquido inflamable clase II de

acuerdo con la Norma 321 de la NFPA (National Fire Protection Association). ([http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/diesel\\_corriente.htm](http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/diesel_corriente.htm)).

Los contaminantes más importantes que se deben controlar en los motores diesel son el material particulado, dióxido de nitrógeno, monóxido de carbono, óxidos de sulfuro, aldehídos y humo. El diesel es el segundo combustible más utilizado para transporte común, usado principalmente en vehículos rápidos y es la fuente de poder preferida debido a la eficacia del combustible en los artefactos (aproximadamente 25 por ciento más eficaz que los artefactos de gasolina) y su durabilidad es muy alta.

Las emisiones del diesel causan una mayor contaminación y tienen peores efectos en la salud que la gasolina. El diesel es considerado por la EPA como un posible carcinógeno para los humanos, también se sabe que las emisiones de diesel están asociadas con el asma. Las pequeñas partículas de los motores diesel son también muy peligrosas, virtualmente todas ellas son más pequeñas que un micrón. (Hay 25,400 micrones en una pulgada el punto (.) al final de esta frase, tiene cientos de micrones a lo ancho. (Estas diminutas partículas pueden evadir las defensas del sistema respiratorio y depositarse en los pulmones. (En general, partículas de menos de 10 micrones en diámetro presentan este problema.) Ellas pueden causar efectos a corto plazo, como dificultad en respirar, tos, así como problemas crónicos respiratorios. Estas partículas respirables son especialmente peligrosas para los ancianos y aquellas personas con problemas respiratorios y enfermedades cardiovasculares. Las emisiones de diesel causan cáncer del pulmón, y pueden también causar cáncer de la vejiga. De acuerdo a los estudios del California Air Resources Board, el estar expuesto durante toda la vida a la contaminación del diesel puede significar una muerte prematura de cáncer para más de 14,000 californianos. Estudios hechos en el sur de California indicaron que el 70 por ciento del riesgo estimado de contraer cáncer durante la vida a causa de la contaminación del aire se atribuye a las emisiones de diesel. Los efectos de las emisiones diesel causan más daños en la salud de los niños por ser especialmente vulnerables al aire contaminado. Sus pulmones, todavía en desarrollo, son muy sensibles y respiran más aire que los adultos (y por lo mismo más contaminación) con relación a su tamaño.

(<http://www.nrdc.org/greengate/espanol/air/dieself.asp>)

**6.3 3 Evaporación de los Combustibles en las Estaciones de Servicio.** Durante el cargue se evaporan 0.2% de combustible y en el tanque principal donde es tomado el combustible se evapora 0.25%. Durante el descargue se evapora 0.07% en el camión cisterna y 0.06% al ser pasado el combustible al tanque principal de la estación de servicio. Para un total de 0.58% de evaporación de combustibles en las estaciones de servicio. (Federación Nacional De Distribuidores De Derivados Del Petróleo, 2002)

**6.3.4 Marcador para productos del petróleo.** A partir del 2002 a los combustibles derivados del petróleo se les realiza un proceso de marcaje, esto con el fin de poder detectar combustibles ilícitos que lleguen a las estaciones de servicio. La composición química del marcador es: Hidrocarburos aromáticos pesados 60%, O-sec-butylfenol 15% y activos 25%. Esta formulación no fue corrosiva a la piel en pruebas con conejos. Los hidrocarburos aromáticos: irritan la piel, los ojos y el tracto respiratorio; DL50 oral en ratas: >5,000 mg/kg, DL50 dermal en conejos: >2,000 mg/kg, irritación en los ojos en conejos: 12.3/110, irritación en la piel de conejos: 1.8/8. O-sec-Butylfenol: es corrosivo, causa quemaduras en la piel y en los ojos, DL50 oral en ratas: >2,700 mg/kg. Y el naftaleno puede causar daños en hígado y riñón, DL50 oral en ratas: >490 mg/kg y el DL50 dermal en conejos: >2,500 mg/kg. (Federación Nacional De Distribuidores De Derivados Del Petróleo, 2002)

## **6.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN SURTIDORES DE COMBUSTIBLE EN ESTACIONES DE SERVICIO**

A pesar de que existe un manual con normas de bioseguridad, los trabajadores no las tienen en cuenta. Dentro de estos manuales de operaciones de las estaciones de servicio se encuentran los siguientes puntos y dispositivos de seguridad, los cuales deben ser cumplidos por los trabajadores. Según (Manuales Mobil, Esso, Texaco y Terpel, 2000), estos dispositivos tienen un fin de ahorrar dinero en los seguros, gastos médicos y evitar accidentes trágicos.

### **6.4.1 Procedimientos para tener el menor contacto con los combustibles**

Usar zapatos antideslizantes con suelas sintéticas, y que no se expongan los dedos de los pies.

Protegerse los ojos con gafas o máscaras de seguridad

Quitarse cualquier prenda de vestir que se contamine de combustible o productos químicos, y lavarse bien la piel.

Lavarse a menudo las manos y los brazos con agua y jabón para eliminar la tierra y la grasa.

Tener cuidado de no tocarse la cara ni los ojos.

Usar guantes de nitrilo para sondear tanques, limpiar los baños, drenar aceite o manejar cualquier producto químico o residuo peligroso.

## **6.5 PRUEBAS CITOGENETICAS**

El DNA es una macromolécula altamente reactiva, por tener grupos nucleofílicos, y es el blanco de muchos agentes portadores de átomos electrofílicos; en consecuencia, muchos agentes físicos y químicos son la mejor causa de alteración del material genético en células eucariotas, por lo que muchos daños pueden ser dados por radiaciones ionizantes o químicos carcinogénicos. (Evans, 1977). Pero gracias a que en las células de todos los

organismos existen sistemas de reparación a cargo de enzimas específicas y muy eficientes algunos daños (lesión primaria) pueden ser reparados, pero debido a la acción de agentes tóxicos del medio, los sistemas de reparación pueden ser alterados y el ADN se vuelve más susceptible a una mayor frecuencia de lesiones las cuales pueden ser no reparadas o mal reparadas. Esto puede expresarse en mutaciones irreversibles que pueden ser manifestadas en problemas de salud, ejemplo el cáncer.

Las pruebas citogenéticas se usan en células somáticas de animales o en cultivo y de humanos principalmente en linfocitos de sangre periférica y son una de las más aceptadas para evaluar efectos genotóxicos por exposición a agentes mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, potencialmente conocidos. Las pruebas citogenéticas más frecuentemente empleadas para la evaluación de los efectos genotóxicos han sido la prueba de Alteraciones cromosómicas (AC); intercambio de cromátidas hermanas (ICH), y micronúcleos (MN) (Hoyos, 1998). Las pruebas cortas (*In vitro e in vivo*) y el monitoreo de personas ocupacionalmente expuestas son necesarios para estudiar sustancias en el ambiente que puedan ser mutagénicas o potencialmente cancerígenas antes de que se presente el cáncer, defectos de nacimiento u otros problemas en humanos (Hoyos, 1998).

## **6.6 LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA: CÉLULAS CENTINELAS**

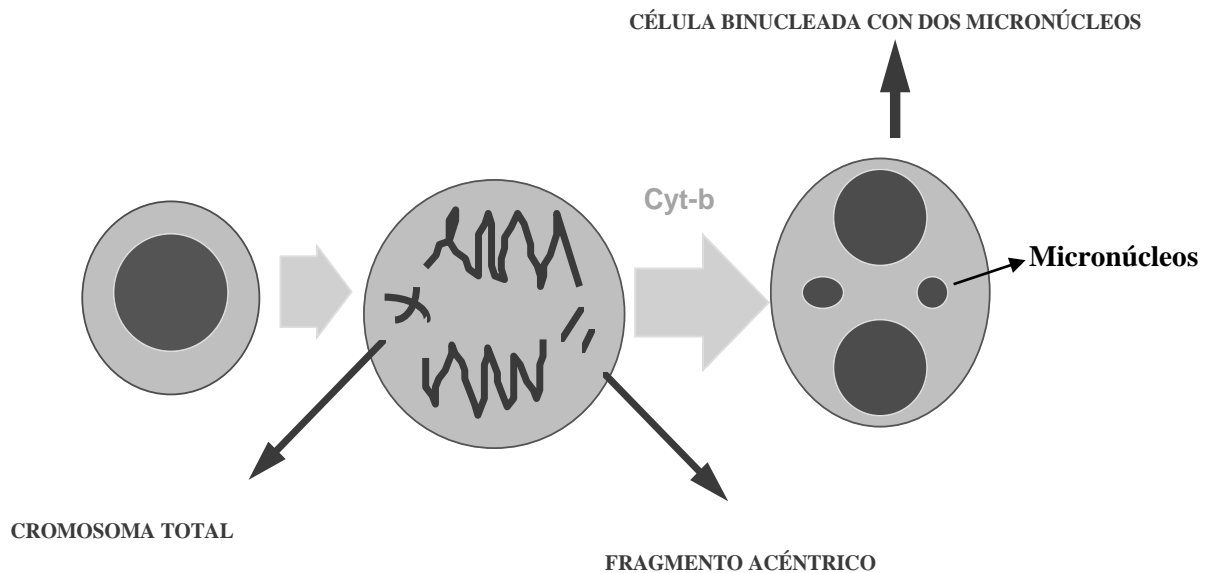
Los linfocitos T de sangre periférica total, son células muy útiles por su fácil obtención, cultivadas por métodos bien estandarizados, y valiosas e ideales para realizar estudios de exposición a agentes genotóxicos, además porque estas células circulan a través de todo el cuerpo en consecuencia son centinelas de lo que puede estar sucediendo en todo el organismo. Los linfocitos tienen una vida media de aproximadamente 4 meses, con una duración del ciclo celular de 24 horas, se encuentran en estado no proliferativo lo cual agregamos fitohemaglutinina al cultivo para estimular los linfocitos a que sufran división celular. En el caso de las lesiones primarias inducidas por un agente genotóxico, la célula debe pasar por la etapa de síntesis (fase S), para que la lesión sea expresada como una mutación irreversible. Solo las lesiones primarias que permanecen sin ser reparadas pueden ser expresadas como alteraciones cromosómicas en metafase y micronúcleos en interfase y pueden ser registradas en el microscopio. (Au, 1991).

## **6.7 PRUEBA DE MICRONUCLEOS (MN)**

Los micronúcleos se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos, cromosomas quebrados o cromosomas enteros que no son incorporados dentro del núcleo de la célula hija durante la división mitótica (Fenech, 2000). En la telofase, una envoltura nuclear se forma alrededor del cromosoma o fragmento perdido y asume la morfología de un núcleo en interfase más pequeño que el núcleo principal. Por su morfología, los micronúcleos son fácilmente detectados al microscopio ya que son pequeños, de forma redonda a ovalada,

compuestos de cromatina, físicamente difieren del núcleo principal haciendo fácil su registro en células interfásicas.

**Figura 2. Origen de los Micronúcleos**



Fuente: Reformado de the *In Vitro* micronucleus technique; Fenech, 2000

Una de las grandes ventajas de la prueba de micronúcleos es que es una técnica muy sensible, sencilla, de bajo costo, de fácil manejo y estadísticamente es más precisa que las alteraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas porque en la prueba de micronúcleos se contabiliza un número mayor de células (miles), mientras en las otras pruebas son unas (cientas). En los micronúcleos se pueden observar translocaciones de cromosomas, pero las translocaciones asimétricas como cromosomas dicéntricos y sus fragmentos acéntricos se asocian formando un puente nucleoplásmico. La frecuencia promedio de micronúcleos en una persona normal es de  $4.4 \pm 2.6$  MN en 500 células bloqueadas en citocinesis. El número de células binucleadas varía entre los individuos de 5-50% (Fenech y Morley, 1985). Ocasionalmente pueden originarse células trinucleadas o tetranucleadas, pero las células que se registran son las que han pasado por una sola división, porque en un segundo ciclo existe la probabilidad de que el daño sea reparado.

Esta técnica ha tenido tanta relevancia que alrededor de ella se ha constituido el proyecto internacional de Micronúcleo Humano (HUMN), este proyecto involucra actualmente a más de 30 laboratorios. Los objetivos de este proyecto son: comparar los resultados obtenidos en las frecuencias MN de los laboratorios, establecer los valores normales de la

frecuencia de MN en la población, detectar las variables que afectan la prueba, establecer criterios de restricción para los laboratorios, comparar y establecer un protocolo estándar que determine la reproducibilidad de la prueba, hacer un estudio prospectivo y determinar la asociación de la frecuencia MN con el envejecimiento y riesgo de cáncer.

**6.7.1 La prueba de micronúcleos convencional.** Fue desarrollada independientemente por Schmid (1975) y por Heddle (1973) en células de medula ósea, en eritrocitos de sangre periférica, y se usan ampliamente para detectar agentes mutágenos o carcinógenos los cuales pueden inducir quiebres o rupturas en los cromosomas o alterar el aparato del huso mitótico. El registro de micronúcleos se hace luego de que ocurra una sola división celular. El método de Micronúcleos Convencional, el cual examina células mononucleadas, ha sido cuestionado porque no permite distinguir las células que se han dividido de las que no lo han hecho en el total de la población de linfocitos; por ello para obviar este problema cinético, se desarrollaron técnicas para conteo de micronúcleos en células que se han dividido una sola vez, como son: La Técnica de Autorradiografía, en la cual se les da a las células un pulso de timidina tritiada que es un marcador. Los micronúcleos aparecerán cuando al tiempo del pulso, las células que estaban en etapa S del ciclo celular, progresaron a través de las etapas G<sub>2</sub>+M. Tomando muestras periódicas y aplicando autorradiografía, es posible contar con micronúcleos en células que han sufrido solo una división. Sin embargo, este método tiene la desventaja que la timidina por sí misma induce a micronúcleos debido probablemente a la radiación emitida por el decaimiento del tritio. La Técnica de Marcaje con Bromodeoxiuridina (Pincu, *et al.*, 1984), permitió que las células incorporen esta sustancia análoga de la timidina del DNA y luego analizando las células por tinción diferencial lo cual permitía ver las que estaban en un primer ciclo de división. Sin embargo, este método también tenía la desventaja de que la bromodeoxiuridina puede por si misma producir alteraciones cromosómicas evidenciadas (Mazrimas y Stetka, 1978).

**6.7.2 Prueba de Micronúcleos con Citocalasina-B.** Fue desarrollada por Fenech y Morley en 1985, quienes utilizaron citocalasina-B para obtener células binucleadas y de esta manera poder registrar micronúcleos en células que solo han experimentado un primer ciclo de división celular. La citocalasina B es una sustancia que inhibe la polimerización de la actina requerida para que se formen microfilamentos que constriñen el citoplasma entre los núcleos de las células hijas, bloqueando la citocinesis o división citoplasmática de la célula, generando células binucleadas La citocalasina B por sí sola no induce micronúcleos. (Fenech y Morley, 1985). La prueba de micronúcleos con citocalasina-B es el método actualmente más usado para medir la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos, los métodos para desarrollar esta técnica han sido recientemente descritos, (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003). Está prueba es aplicada en monitoreo de poblaciones para estudiar el efecto de los daños en el ADN en la exposición in vivo, para ver efectos genotóxicos de nuevos químicos y en poblaciones que han estado expuestas a bajas dosis de radiaciones

gamma, organoclorados, enfermeras (óxido nítrico, anticancerígenos), fumadores e individuos con enfermedades crónicas, (Fenech *et al.*, 1999).

**6.7.3 Significancia biológica de los micronúcleos.** El estudio de daños al DNA a nivel cromosómico, es una parte importante de la Toxicología Genética porque las mutaciones en el ADN constituyen un evento inicial en el proceso de carcinogénesis (Fenech, 2000). La prueba de micronúcleos puede ser utilizada para ver tanto efectos clastogénicos como aneugénicos (Norppa y M.Falck, 2003). La presencia de micronúcleos puede tomarse como un indicador de la existencia previa de alteraciones cromosómicas, porque estos contienen piezas quebradas de cromosomas. Los defectos producidos en los cromosomas pueden conducir a largo plazo al desarrollo de enfermedades como el cáncer, defectos de nacimientos y otras enfermedades genéticas (Au, 1991). Las anomalías cromosómicas han sido asociadas a diversos tipos de cáncer como leucemia, retinoblastoma, entre otros. Una frecuencia alta de micronúcleos es observada en células de pacientes con enfermedades congénitas como el síndrome de bloom, ataxia telangiectasia (Duffaud *et al.*, 1997). Así mismo los fumadores regulares de cigarrillo tienen una elevada frecuencia de micronúcleos en comparación con los no fumadores (Hösted *et al.*, 1983), al comparar la frecuencia de micronúcleos en pacientes con cáncer con pacientes sanos, encontraron un 20% para el grupo con cáncer y un 9.7% para el grupo control (Duffaud, *et al.*, 1997).



## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 TIPO DE ESTUDIO**

Se realizó un monitoreo genético; tipo cross-sectional. Se empleó un biomarcador de efecto, la prueba de micronúcleos MN.

### **7.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en los vendedores de servicio de combustibles en la ciudad de Popayán.

**Figura 3. Vendedores de Servicio**



### **7.3 MOTIVACIÓN E INDUCCIÓN AL ESTUDIO**

Se hizo una presentación del estudio a los dueños de las estaciones de servicio mostrándoles los objetivos, metodología y plan de actividades. Una vez valorado el estudio por los dueños, se presentó el proyecto a la población total objeto de estudio, para que en forma voluntaria se decidieran y motivaran a participar en el estudio.

### **7.4 SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Una vez informados y motivados a participar en el estudio, se les realizó una encuesta corta con el fin de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, el primer criterio de inclusión era que llevaran cinco o más años trabajando en las estaciones de servicio y el de exclusión que fueran fumadores.

Después de realizar la encuesta corta y hacer una preselección de la población se les hizo una encuesta mas completa, para hacer la selección del grupo con el fin de conocer un poco mas sobre sus actividades rutinarias, estilo de vida y obtener sus datos personales (edad, dirección de su residencia, teléfono etc.) y terminar de aplicar los criterios de inclusión y exclusión. Los criterios de inclusión eran: aceptación voluntaria a participar en el estudio, que fueran trabajadores saludables, mínimo cinco años de exposición a los combustibles, que no usaran medidas de protección. Los criterios de exclusión: fumadores, consumir demasiado alcohol, drogas o medicamentos permanentemente y haber estado expuestos a otro tipo de agentes físicos o químicos, tales como radiaciones ionizantes y químicos carcinogénicos.

El grupo control fue seleccionado y rechazado con base en criterios similares a los empleados en la selección del grupo expuesto, excepto que no debían haber estado expuestos a los combustibles ocupacionalmente, pero que tuvieran las mismas características físicas, socioeconómicas y que fueran personas saludables, para ser emparejadas lo mejor posible con el grupo expuesto; de manera que los integrantes de cada pareja solo se diferenciaron entre si por la exposición a combustibles. Las personas del grupo control se seleccionaron en instituciones educativas (universidades y colegios nocturnos). Los seleccionados firmaron un consentimiento informado con previo conocimiento de los beneficios, riesgos, objetivos, metodología y propósito del estudio, para participar y colaborar. En este proyecto se estudiaron 20 personas por el grupo control y 20 personas para el grupo expuesto.

## **7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL**

En este estudio se tuvo en cuenta dos variables, una de tipo dependiente que es el número de Micronúcleos, la cual toma esta clasificación porque su frecuencia va a depender de la exposición a los combustibles, constituyéndose esta última en una variable de tipo independiente.

Del total de encuestados expuestos a los combustibles y de los no expuestos se seleccionó una población de 20 individuos expuestos y de 20 individuos para el grupo control. En la metodología del proyecto de MN en humanos se recomienda registrar una frecuencia de MN/1000 células binucleadas, en el presente estudio se registraron 2000 lo que hace más significativos estadísticamente los resultados. Dos cultivos fueron establecidos por individuo, de cada cultivo se obtuvieron tres placas, para un total de seis placas y en cada placa se leyeron 333 células.

## **7.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Es claro que entre mayor sea la muestra mejor será el poder de análisis estadístico, pero lo más importante es la precisión con que se recopilen los datos y la forma de obtener una muestra representativa. Cuando mayor sea el tamaño de la muestra, mayor será la probabilidad de encontrar una diferencia significativa. El tamaño de la muestra para el análisis de alteraciones cromosómicas y de micronúcleos según Whorton, 1981 puede ser de 20 individuos en el grupo control y de 20 individuos en el grupo expuesto.

## **7.7 ADQUISICIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE**

Se tomaron muestras de sangre periférica de aproximadamente 2 ml, obtenidas por personal capacitado, de las personas expuestas y de las no expuestas. Las muestras fueron tomadas en el lugar de trabajo asépticamente en tubos vacutainer con anticoagulante heparina. Inmediatamente las muestras fueron rotuladas y transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética, donde se realizó la siembra y cosecha de linfocitos para el registro de los micronúcleos MN.

## **7.8 CULTIVO DE LINFOCITOS**

Las muestras se cultivaron según la metodología IAEA (1986), en la cámara de flujo laminar, en condiciones estériles, añadiendo 0.5 mL de sangre total en 4.5 mL de medio completo RPMI 1640 y 0.05 mL de fitohemaglutinina, por tubo de cultivo de acuerdo a parámetros establecidos (Au *et al*, 1991). Se establecieron dos cultivos por persona. El medio completo se preparó con 50 mL RPMI 1640, 5 mL de suero bovino fetal y 0.5 mL de L-Glutamina.

## **7.9 COSECHA DE LINFOCITOS**

Los tubos de cultivo fueron incubados a 37°C por 72 horas. A las 44 horas después de iniciados los cultivos, se les adicionó a cada cultivo 0.2 mL de citocalasina B a una concentración de 6 ug/mL, para inhibir la citocinesis y obtener células binucleadas (primer ciclo de división celular); luego de las 72 horas después de la siembra se realizó la cosecha de linfocitos. Los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, luego las células fueron tratadas con solución hipotónica por 3 minutos e inmediatamente fijadas con fijador carnoy (3 Metanol- 1 Ácido acético) bien frío. Se removió el botón celular con mucho cuidado y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. Después se retiró el sobrenadante y se agregó fijador por tres veces sucesivamente, luego se procedió a la obtención de las preparaciones citogenéticas. Las placas fueron limpiadas con etanol al 100% y colocadas en el refrigerador por 10 minutos para que se enfriaran. Se colocaron 3 gotas de la suspensión celular sobre la placa bien fría a una altura de 0.5 cm., se codificaron y luego se pusieron a secar por 30 minutos a una temperatura de 56°C. De cada cultivo se realizaron como mínimo tres placas, con el fin de obtener una muestra estadísticamente confiable. En cada placa se analizaron aproximadamente 333 células para un total de 2000 células

binucleadas por persona. Una vez bien secas las preparaciones, dos días después fueron teñidas con Giemsa al 10% por 3 minutos.

#### **7.10 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

El análisis Citogenético y el registro de Micronúcleos en las placas se realizaron bajo objetivo de 40X y 100X aplicando la técnica del doble ciego para evitar sesgar los resultados y garantizar la confiabilidad de los mismos, teniendo en cuenta los mejores campos para el conteo y el registro fotográfico. Para la identificación de MN se analizaron 2000 interfases binucleadas por persona y se emplearon criterios establecidos por (Fenech, 2.000), el registro de MN solo se hizo en células binucleadas con membranas nucleares y citoplasma intacto, los dos núcleos dentro de la célula deberían tener un tamaño aproximadamente igual y con la misma intensidad de coloración, los dos núcleos pueden estar o no unidos por un fino puente nucleoplásmico y pueden tocarse o traslaparse en las preparaciones donde se ha preservado el citoplasma. Los dos núcleos debían tener membranas nucleares y estar situados dentro del mismo citoplasma de la célula; el citoplasma de las células debe diferenciarse de otros citoplasmas de células adyacentes. Los micronúcleos deben ser morfológicamente idénticos al núcleo pero más pequeños. El diámetro del micronúcleo varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal. Los micronúcleos tienen la misma intensidad de coloración del núcleo principal aunque ocasionalmente pueden ser más intensos y estos pueden tener forma redonda u ovalada El dato de MN por persona se expresó como número de MN/2000 células, (Fenech, *et al*, 2003)

Los datos de la frecuencia de micronúcleos en 2000 células binucleadas se registraron en la tabla maestra (ver anexo D). Después los datos fueron ingresados al programa Excel y una vez organizados se transfirieron al paquete estadístico SPSS (Statiscal Package for to Social Scientific), para su análisis estadístico descriptivo y referencial. Se aplicaron pruebas de distribución normal, independencia de datos y uniformidad de varianza para determinar si los datos cumplieron con los requerimientos para aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas en el análisis de las frecuencias de micronúcleos, con el fin de comparar los grupos y demás factores importantes en el estudio, así como un análisis de correlación y regresión lineal para identificar la asociación entre variables cuantitativas (Ej.: número de MN y tiempo de exposición a los combustibles). El número promedio de micronúcleos en 2000 células binucleadas cumplió con la asunción de igualdad de varianza (Levene:  $p > 0.05$ ), pero no se adaptó a la distribución normal (Shaphiro-Wilk:  $p < 0.05$ ); por lo tanto el análisis estadístico de los datos se realizó mediante las pruebas no paramétricas de Wilcoxon.

Los resultados de este estudio serán comunicados a la población objeto de estudio para alertar sobre el riesgo y motivar a la promoción y prevención de la salud

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACION DE ESTUDIO

En la Tabla 1 se resumen las características demográficas de 20 trabajadores expuestos ocupacionalmente a los combustibles y de 20 individuos no expuestos; todos los individuos objeto de estudio fueron hombres. Entre los dos grupos no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) con relación al consumo de bebidas alcohólicas y edad, indicando que los dos grupos estudiados fueron apareados de manera muy homogénea, para evitar posibles sesgos en el análisis de los datos de la prueba evaluada en este estudio (micronúcleos). Como se ha de esperar solo para el tiempo de exposición se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.00$ ) entre los dos grupos.

**Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio**

| CARACTERISTICA                        | EXPUESTOS<br>N(%) | NO EXPUESTOS<br>N(%) | SIGNIFICANCIA<br>(P)    |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>Consumo de Bebidas Alcohólicas</b> |                   |                      |                         |
| Si                                    | 4(20)             | 5(25)                | <b>1.00<sup>a</sup></b> |
| No                                    | 16(80)            | 15(75)               |                         |
| <b>Edad (Años)</b>                    |                   |                      |                         |
| N                                     | 20                | 20                   | <b>0.86<sup>b</sup></b> |
| Rango                                 | 28-50             | 27-52                |                         |
| Media ± Error Estándar                | 37.70±1.12        | 37.40±1.28           |                         |
| <b>Tiempo Exposición (Años)</b>       |                   |                      |                         |
| N                                     | 20                | 20                   | <b>0.00<sup>b</sup></b> |
| Rango                                 | 6-18              | 0                    |                         |
| Media ± Error Estándar                | 10.60±0.97        | 0.00±0.00            |                         |

N número de individuos

<sup>a</sup> Estadístico exacto de Fisher

<sup>b</sup> Prueba t de Student

### 8.2 EFECTO GENOTOXICO POR LA EXPOSICION OCUPACIONAL A COMBUSTIBLES

En la Tabla 2 y en la Figura 4 se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0,00$ ) en el N° promedio de MN/2000 células binucleadas entre el grupo expuesto a combustibles ( $7.99 \pm 0.64$ ) y el grupo no expuesto ( $4.36 \pm 0.63$ ). Esto es independiente del consumo de bebidas alcohólicas y de la edad; pero si es dependiente del tiempo de exposición a los combustibles.

**Tabla 2. Número Promedio de Micronúcleos del grupo expuesto a combustibles y del grupo no expuesto**

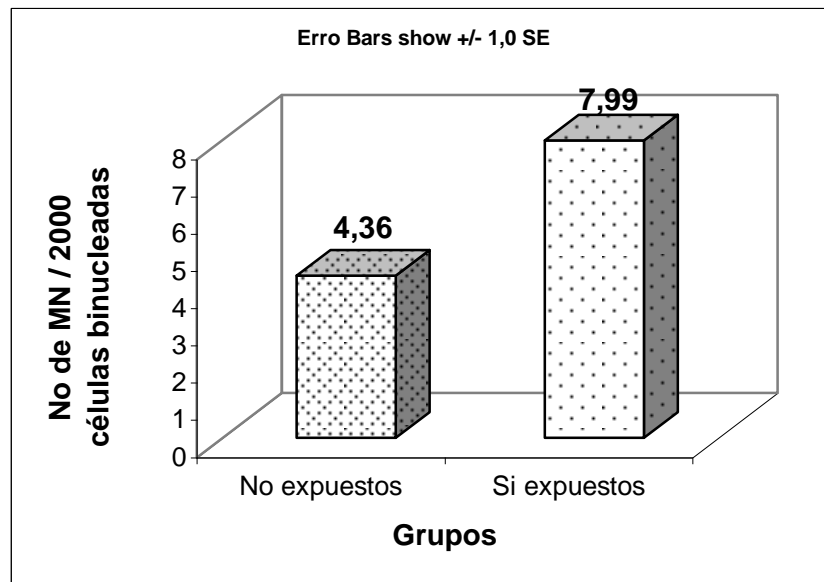
| GRUPO          | N  | NÚMERO DE CÉLULAS<br>BINUCLEADAS<br>EXAMINADAS POR<br>INDIVIDUO | MICRONÚCLEOS        |                 |
|----------------|----|---|---------------------|-----------------|
|                |    |   | M ± EE <sup>a</sup> | P <sup>bc</sup> |
| No<br>Expuesto | 20 | 2000  | 4.36±0.63           | <b>0.00</b>     |
| Expuesto       | 20 | 2000  | 7.99±0.64           |                 |

<sup>a</sup> Media ± Error Estándar

<sup>b</sup> P = 0,000 basado en contrastes univariados, mediante el ANOVA ajustado con las variables reportadas en la Tabla 1.

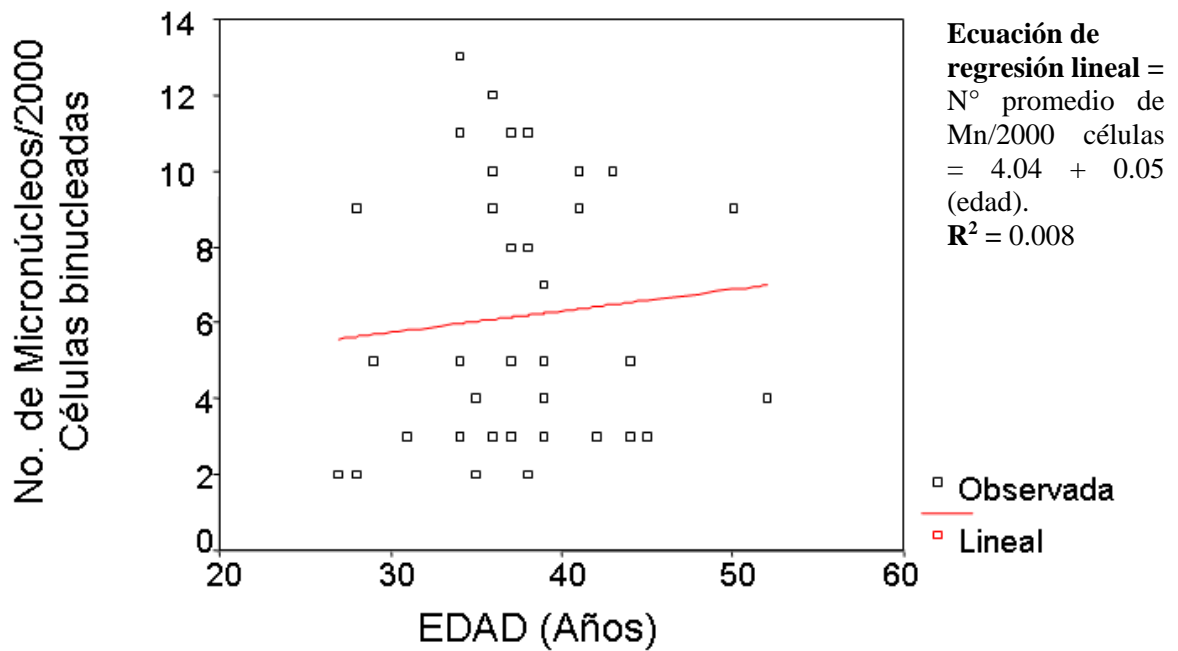
<sup>c</sup> probabilidad confirmada con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney

**Figura 4. Número promedio de micronúcleos del grupo expuesto a combustibles respecto al grupo no expuesto**



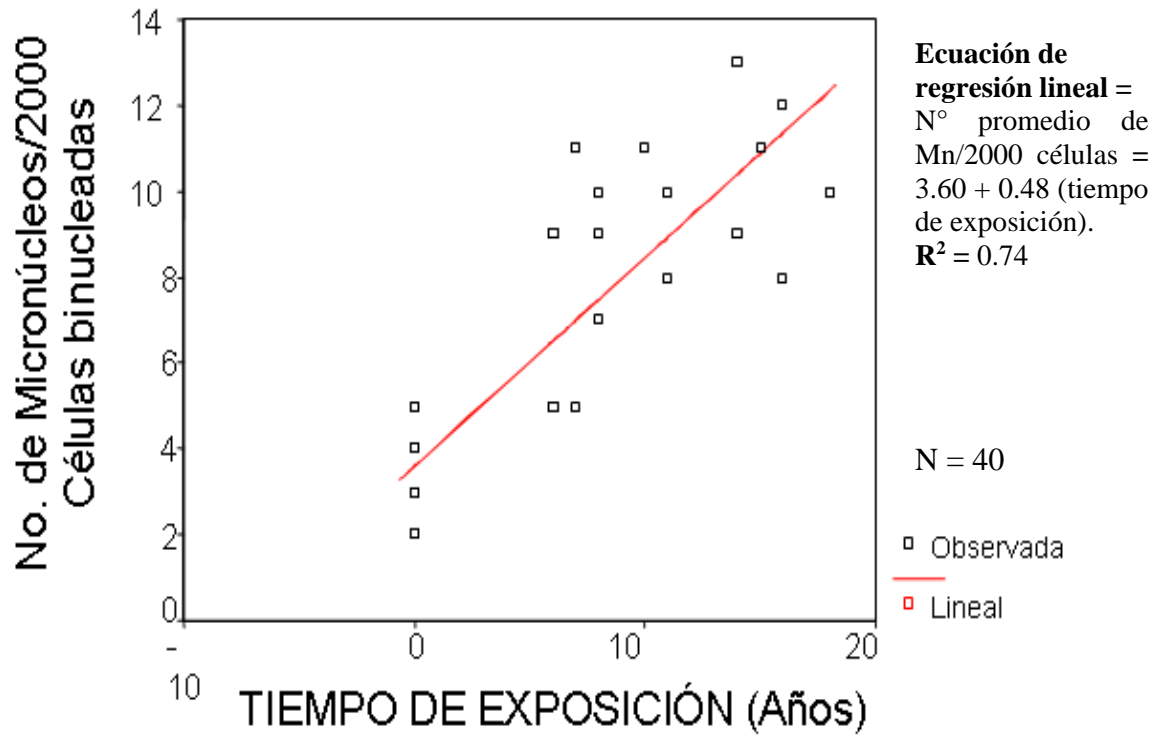
### 8.3 ASOCIACIÓN ENTRE NÚMERO PROMEDIO DE MICRONÚCLEOS, EDAD Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LOS COMBUSTIBLES (AÑOS).

Figura 5. Análisis de asociación lineal entre el número promedio de micronúcleos y la edad (años)



En la Figura 5 se observa que mediante el análisis de regresión lineal no hay una relación estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre la edad de los individuos ( $N=40$ ) y el número promedio de micronúcleos, el cual solo depende en 0.8% de la edad

**Figura 6. Análisis de asociación lineal entre el número promedio de micronúcleos y el tiempo de exposición a los combustibles (años)**



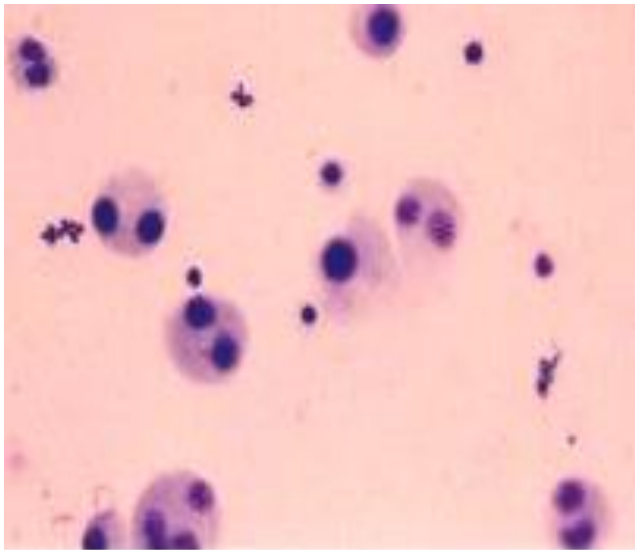
En la figura 6 se observa que existe una asociación lineal estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), entre el tiempo de exposición a los combustibles y el número de micronúcleos, el cual solo depende en 74.3% del tiempo de exposición.



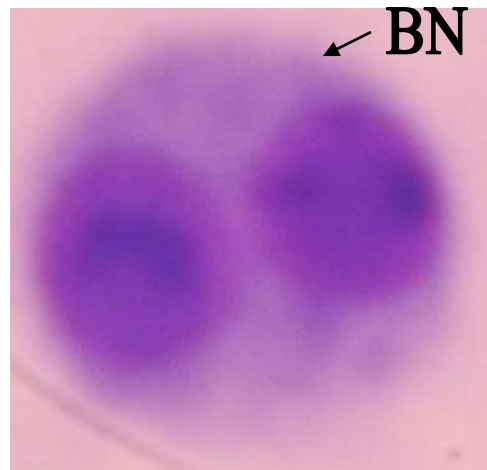
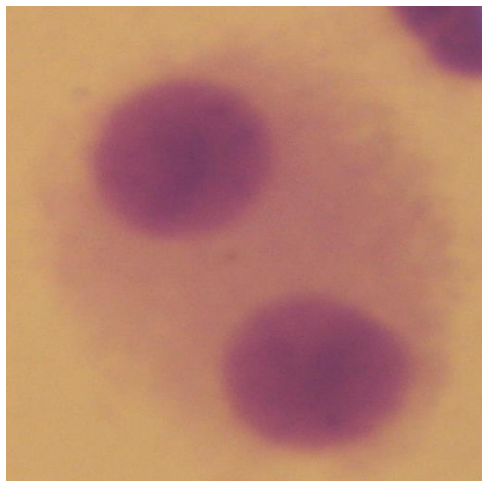
#### 8.4 REGISTRO FOTOGRÁFICO

El análisis Citogenético y el registro de Micronúcleos en las placas se realizaron bajo objetivo de 40X y 100X teniendo en cuenta los mejores campos para el conteo y el registro fotográfico. Los MN solo se registraron en células binucleadas con membranas nucleares y citoplasma intacto, los dos núcleos debían tener membranas nucleares y estar situados dentro del mismo citoplasma de la célula. Los micronúcleos deben ser morfológicamente idénticos al núcleo pero más pequeños, estos pueden tener forma redonda u ovalada (Fenech, *et al*, 2003),

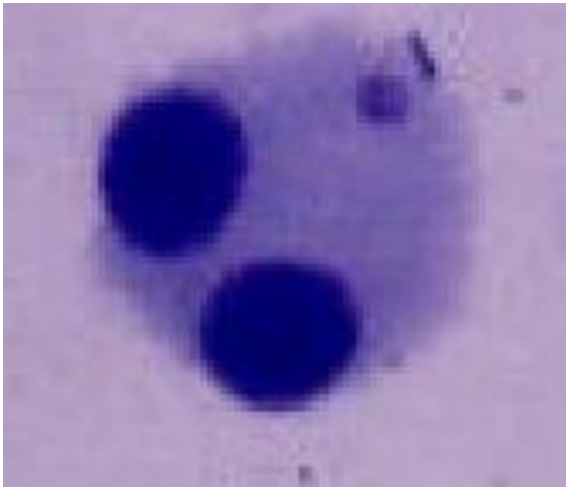
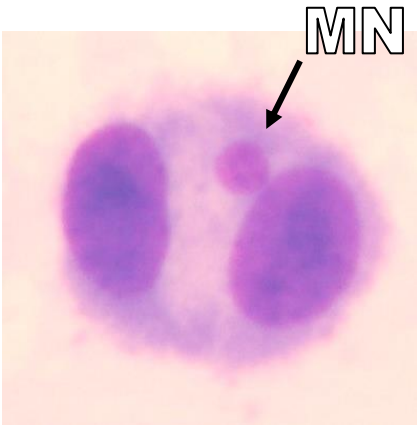
**Figura 7. Panorámica de células binucleadas 40X**



**Figura 8. Células binucleadas (BN) de linfocitos humanos generadas por bloqueo de citocinesis con Citocalasina-B. 100X.**



**Figura 9. Células binucleadas con micronúcleos (MN), 100X.**



## 9. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó la prueba de micronúcleos por bloqueo de citocinesis con Citocalacina-B en linfocitos de sangre periférica. Este es el procedimiento de preferencia para cuantificar micronúcleos en linfocitos humanos (Fenech, 2003) porque garantiza el registro de MN sólo en células que han realizado un primer ciclo de división celular. Las células empleadas para este estudio fueron los linfocitos, células centinelas que circulan por todo el cuerpo e ideales para evaluar el efecto genotóxico por su largo promedio de vida y capacidad para acumular daños por mucho tiempo (Au, 1991). Además, se utilizaron los linfocitos porque son fáciles de obtener y están aceptados ética y científicamente.

La prueba de micronúcleos en células binucleadas de linfocitos humanos es considerada como un método relevante para cuantificar daños cromosómicos inducidos (Fellay-Reynier, *et al.*, 2000). Los defectos producidos en los cromosomas pueden conducir a largo plazo al desarrollo de serias enfermedades como el cáncer, defectos de nacimientos y otras enfermedades genéticas (Au, 1991). Esta prueba puede ser utilizada para ver tanto efectos clastogénicos como aneugénicos (Norppal, H. y M.Falck G, 2003). Kirsh-volders, (1997) sugiere la prueba de micronúcleos para evaluar efectos genotóxicos en lugar de la prueba de alteraciones cromosómicas para medir la genotoxicidad de químicos nuevos, ya que es de fácil manejo, bajo costo y se evita la complejidad de analizar daños en metafases.

Muchos químicos son utilizados en todo el mundo, algunos de estos son tóxicos. Sus efectos a corto plazo se conocen (dolor de cabeza, dermatitis, problemas respiratorios, conjuntivitis, mareos, etc.), pero los efectos a largo plazo, como los mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, son poco conocidos, razón por la cual es importante y prioritario realizar investigaciones para evaluar los efectos genotóxicos que estos pueden llegar a producir.

Uno de los químicos más utilizados y explorados en todo el mundo son los combustibles derivados del petróleo, estos contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales son carcinogénicos y han sido asociados con efectos genotóxicos (Farmer *et al.*, 2003). El benceno es un hidrocarburo aromático, componente de los combustibles y un contaminante ampliamente distribuido en el ambiente. Hoy, cerca del 98% del benceno se deriva de petroquímicos y del petróleo refinado, (Ayla *et al.*, 2003). Este compuesto es considerado por la IARC, (1989) como un carcinógeno humano, y los vapores de la gasolina como posible cancerígeno por tener este compuesto. La población en general se expone al benceno cuando va a tanquear su vehículo con gasolina o diesel, y con el humo del cigarrillo (Zhang *et al.*, 2002); pero se encuentran en mayor riesgo los vendedores de servicio, porque constantemente están expuestos a los combustibles en su lugar de trabajo.

La exposición ocupacional al benceno ha sido principalmente asociada con un aumento en la incidencia de leucemias (Hayes *et al.*, 2000). Estudios epidemiológicos muestran que hay una relación entre el aumento en la frecuencia de micronúcleos (MN) y exposición al benceno y metabolitos del benceno (Tompa *et al.*, 1994; Turkel y Egeli, 1994).

Los vendedores de servicio seleccionados en este estudio no emplean medidas de protección (guantes, caretas, etc.), razón por la cual se encuentran en mayor riesgo de desarrollar problemas de salud por la exposición a los combustibles. Estos trabajadores no sólo se exponen a los hidrocarburos presentes en los vapores de los combustibles por inhalación, sino también por la vía epidérmica, así la piel este intacta. Se ha demostrado que el benceno es fácilmente absorbido a través de la piel y biotransformado por la enzima del citocromo P450 a metabolitos que pueden inducir a rupturas en la cadena sencilla de ADN, (Pellack y Blumer, 1986). Algunos trabajadores presentaban dermatosis, cambios en la piel, conjuntivitis, dolor de cabeza etc, después de su jornada de trabajo. Un estudio realizado por Jia *et al.*, (2002) en estos trabajadores y en un grupo control empleando cromatografía de capa fina, evaluaron algunos lípidos (colesterol, ácido graso y ceramida) de las manos de estos individuos. Los resultados mostraron que había mayor resequedad, hiperqueratosis y dermatitis en el grupo expuesto que en el grupo control. Estos trabajadores también están expuestos a las emisiones vehiculares. Un estudio mostró que estas emisiones también pueden causar efectos citotóxicos y genotóxicos tales como AC, ICH (Hadnagy y Seemayer, 1988).

En la población de vendedores de servicio se han realizado diferentes pruebas citogenéticas entre ellas AC, ICH, MN y prueba cometa. Sin embargo, los datos de estos estudios son bastantes contradictorios, porque en algunos estudios se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $P=0,00$ ) en la frecuencia de daños citogenéticos entre el grupo expuesto a combustibles y el grupo no expuesto; mientras que en otros estudios no se han encontrado diferencias ( $P>0,05$ ). Investigaciones realizadas por Pitarque *et al.*, (1996 y 1997), Bukvic *et al.*, (1998), Carere *et al.*, (1995 y 1998); utilizando la prueba de ICH y MN no hallaron incremento en la frecuencia. Estos autores argumentan que este resultado puede ser atribuido a que los niveles de benceno en la población expuesta eran bajos ( $<0.1\text{ppm}$ ) para poder ser detectados por las pruebas citogenéticas dando un resultado negativo; hay que tener en cuenta que la exposición a el benceno en los vendedores de servicio puede variar ampliamente debido a varios factores, como la cantidad de combustible vendido, el tipo y número de vehículos tanqueados, a las medidas de protección que utilicen y al volumen total de benceno en los combustibles.

Diferencia significativa fué encontrada entre los grupos, en estudios realizados por Santos-Mello y Cavalcante, (1992), Carere *et al.*, (1995) y Ayla Celik - Etem Akbas, (2003) aplicando la prueba de ICH y AC; Hogstedt *et al.* (1991), Bukvic *et al.*, (1998) y Ayla

Celik *et al* (2003) empleando la prueba de MN; Oesch, *et al.*, (1995) y andreoli, *et al.* (1997) encontraron rupturas en la cadena de ADN en linfocitos de sangre periférica de vendedores de combustibles usando la prueba del cometa. Los combustibles son una mezcla compleja de muchos químicos, entre estos los hidrocarburos aromáticos y en especial el benceno, este compuesto es considerado por la IARC, (1989) como un carcinógeno humano y los vapores de la gasolina como posible cancerígeno por tener este compuesto. La gasolina contiene un porcentaje del 33.2% de hidrocarburos aromáticos.

Según datos obtenidos de las estaciones de gasolina cada vendedor expende un promedio de 2000 litros de combustible, conteniendo el 5% de benceno (v/v), durante su turno de trabajo diario de 8 horas, (Ayla *et al.*, 2003). Una investigación realizado por Foo, (1991) demostró que la gasolina contiene un promedio de benceno entre 1.8% a 3.7%, por esta razón la exposición a la gasolina, nos lleva a un riesgo significativo ante el benceno. Los vendedores de combustibles en su turno de 8 horas están en promedio expuestos a 0.028 a 0.71 ppm. La reglamentación Europea clasifica la gasolina como un agente carcinógeno debido a la cantidad de benceno >0.1% que en ella se encuentra, (Maranelli *et al*, 2000). Sin embargo los vendedores de servicio se encuentran expuestos a una mezcla compleja de varios químicos, factores físicos, estilo de vida y a la susceptibilidad que posee cada individuo, por eso es muy difícil determinar la causa exacta del incremento en la frecuencia de los daños citogenéticas, (Ayla *et al.*, 2003).

En este estudio se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.00$ ) en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica del grupo expuesto ( $7.99\pm 0.64$ ) respecto al grupo control ( $4.36\pm 0.63$ ). Los resultados muestran que las características demográficas entre el grupo expuesto y el grupo control no difieren significativamente ( $P>0.05$ ). Fumar cigarrillo es uno de los factores que pueden influir en el aumento de daños citogenéticos como las AC, ICH y MN (Pitarque, *et al.*, 1997) razón por la cual en este estudio no se incluyeron personas fumadoras. Las diferencias observadas en la frecuencia de micronúcleos podrían atribuirse a la exposición ocupacional a los combustibles y posiblemente a sus componentes como es el benceno, sabemos que este compuesto es un carcinógeno humano, es posible que el porcentaje de este en la gasolina y el diesel sea alto y este ocasionando daños citotóxicos y genotóxicos en estos trabajadores. Un estudio realizado por Muzyka *et al.*, (2002) en trabajadores que distribuyen diesel mostraron que este contiene benceno y que causa alteraciones en el metabolismo de las porfirinas, algunas de estas pueden llevar a la generación de tumores. A partir del 2002 a los combustibles se les esta realizando un proceso de marcaje; la composición química del marcador contiene un 60% de hidrocarburos aromáticos, 15% O-sec-butyfenol y 25% de activos.

Como se puede observar este proceso esta ayudando aumentar la concentración del benceno en los combustibles. La exposición a combustibles en los vendedores de servicio de esta

ciudad puede variar debido a la cantidad de combustible vendido, el tipo y número de vehículos que tanquean, a las medidas de protección que utilicen, y al volumen total de benceno en los combustibles; el volumen de benceno en los combustibles y los niveles de este en las estaciones de servicio del país son desconocidos, esto es una dificultad para determinar claramente si la ausencia/presencia de daños genéticos puede ser asociada a alta/baja exposición.

Se conoce que la evaporación de los combustibles en las estaciones de servicio del país es de 0.2% durante el cargue, 0.25% en el tanque principal donde es tomado el combustible, 0.07% durante el descargue y 0.06% al ser pasado el combustible al tanque principal de la estación de servicio. Para un total de 0.58% de evaporación de combustibles. (Federación Nacional del Petróleo, 2002). Cada trabajador en el turno diario revisa dos veces el tanque principal de la estación de servicio y en cada oportunidad están expuestos a 0.06 % de evaporación de combustible; esta actividad expone aun mas a los trabajadores a los vapores de la gasolina y el diesel, además de la inhalación a la cual están expuestos cada vez que tanquean los carros y a las emisiones vehiculares que estos producen.

En el análisis de asociación lineal entre el número promedio de micronúcleos y la edad (años), no se encontró relación estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ), revelando que la edad de los individuos no influye con el número de micronúcleos que ellos puedan presentar. Por el contrario se encontró una asociación significativa entre el tiempo de exposición a los combustibles (años) y el número promedio de micronúcleos, esto muestra que entre mayor sea el tiempo de exposición mayor serán los daños citogenéticos que los combustibles puedan ocasionar en los individuos y mayor será el riesgo a desarrollar problemas de salud como el cáncer.

Fenol es el metabolito principal del benceno. Por consiguiente, la concentración del fenol en la orina de los vendedores de combustibles pueden usarse como un biomarcador de exposición externa. Estudios realizados en los vendedores de combustibles respecto a un grupo control, mostraron un nivel mas alto de fenol en la orina de los individuos del grupo expuesto, (Verma y Rana, 2001; Ayla *et al*, 2003). Seria interesante aplicar esta prueba en nuestro grupo de estudio y así poder documentar la exposición a la cual estas expuestos los vendedores de combustibles de la ciudad de Popayán.

Identificar a tiempo los efectos genotóxicos causados por la exposición ocupacional en las personas que aun no presentan problemas de salud, permitirán tomar medidas para reducir la exposición y disminuir el riesgo de enfermedades de origen ambiental. (Anderson *et al.*, 1996).

## 10. CONCLUSIONES

La exposición a combustibles tiene un efecto genotóxico para los linfocitos de los vendedores de combustibles, incrementando la frecuencia promedio de micronúcleos (MN).

Se observó que existe una asociación lineal positiva entre el incremento de MN y el tiempo de exposición (años) a los combustibles, a medida que se aumenta los años de exposición, hay una tendencia a causar mayor efecto genotóxico, incrementando el número promedio de MN.

Con este estudio se pudo determinar que la edad de los individuos seleccionados no presenta asociación significativa con el incremento de MN, es decir que la edad no influye en la formación de daños genotóxicos.

Este estudio permitió identificar los efectos genotóxicos precoces causados por la exposición ocupacional a los combustibles en las personas que aun no presentan problemas de salud, lo cual servirá para tomar medidas que reduzcan la exposición y disminuyan el riesgo de enfermedades de origen ocupacional.

Estos resultados revelan que los vendedores de combustibles podrían estar en mayor riesgo de desarrollar problemas de salud. Los MN son un biomarcador útil para evaluar daños genotóxicos causados por la exposición ocupacional a los combustibles.

El estudio de daños al DNA a nivel cromosómico, es una parte importante de la toxicología genética porque las mutaciones cromosómicas son un evento inicial en la génesis de las enfermedades como el cáncer y es importante dentro del proceso investigativo desarrollar técnicas que permitan identificar los daños precoces en el material genético por exposición a agentes genotóxicos<sup>7</sup>

## **11. IMPACTO**

Los resultados de este estudio serán presentados a la población afectada (vendedores de servicio) y a los interesados, con el propósito de dar a conocer los posibles riesgos de la exposición a los combustibles; mediante un seminario mostrándoles como se desarrolló el trabajo, que fue lo que se hizo y que se obtuvo, además se les darán charlas de prevención y de autocuidado para que cuiden su salud. Esto con el fin de poder realizar estrategias de prevención que reduzcan o eliminen la exposición y de esta manera minimizar o evitar posibles problemas de salud en el futuro, como por ejemplo adquirir una enfermedad relacionada con daños genéticos (cáncer), en las personas expuestas y en su posterior descendencia, y con esto ayudar a mejorar la calidad de vida de las personas.

Además, los resultados de este estudio son de gran impacto ya que investigaciones de este tipo de exposición (combustibles) no han sido realizadas en Popayán, con lo que ayudaríamos a ampliar el conocimiento de los riesgos de salud relacionados con la exposición ocupacional y ambiental. Y se contribuye a la base de datos sobre la frecuencia de MN en poblaciones controles que permitan en un futuro establecer la frecuencia normal de MN en nuestra población.

Esta investigación aporta nuevos conocimientos que amplían la bibliografía científica sobre los efectos genotóxicos de los combustibles. Se proyecta que la formación profesional adquirida en el transcurso de la carrera se proyecte en el bienestar de la comunidad, educando a las personas sobre como algunos químicos pueden ser genotóxicos, en este caso los componentes de los combustibles y que estos pueden llegar afectar su salud y de esta forma motivar para que las personas se preocupen por el autocuidado y cuiden de su salud que será transmitida a las futuras generaciones.



## BIBLIOGRAFÍA

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES Y DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for fuel oils. Atlanta, GA: U.S. Department of Health y Human Services, Public Health Service. 1995; p. 1-231

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES Y DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for gasoline. Atlanta, GA: U.S. Department of Health y Human Services, Public Health Service. 1995; p. 1-224

ANDERSON, D. *et al.* Ras oncoproteins in human plasma from lung cancer patients y healthy y controls. En: Mutation Research. Vol. 349, N°1. 1996; p. 121-126

ANDREOLI, C., *et al.* Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis, after exposure to benzene y benzene metabolites. En: Mutation Research. Vol. 377. 1997. p. 95-104.

AU, William. Cytogenetic assays in monitoring human exposure y prediction of risk. En: Environmental Mutagens, Carcinogens y Teratogens. 1991; p.236-245

----- . Monitoring human populations for effects of radiation y chemical exposure using cytogenetic techniques. En: Occupational Medicine: State of de Art Reviews. Vol. 6, N° 4. 1991; p.597-611

AYLA, Ç. y ETEM A. Evaluation of sister chromatid exchange y chromosomal aberration frequencies in peripheral bloom lymphocytes of gasoline station attendants. En: Ecotoxicology y environmental safety. Vol. 1, N°. 1. 2003; p.1-7.

AYLA Ç, *et al.* Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells En: Mutagenesis. Vol. 18, N°. 5. 2003; p. 417-421

BLOOM, AD. Guidelines for studies of human populations exposed to mutagenic y reproductive hazards, 1981

BOECKX, RL; POSTI, B y COODIN, FJ. Gasoline sniffing y tetraethyl lead poisoning in children. En: Pediatrics. Vol.60, 1977; p. 140-145.

BOLOGNESI, *et al.* Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. En: Environmental Molecular . Vol.30, 1997; p.396-402

BONASSI, Stefano *et al.* Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis –block micronucleus assay in human lymphocytes: 1. effect of laboratory protocol, scoring criteria y host factors on the frequency of micronuclei. En: Environmental y Molecular Mutagenesis. Vol.37. 2001; p. 31-45

----- . Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. En: Cancer Genetics Cytogenetics. Vol. 79. 1995; p.133–135

BUKVIC *etal.* Sister chromatid exchange (SCE) y micronucleus frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. En: Mutation Research. Vol. 415, N°1. 1998; p. 225-233

CARERE, A. *et al.* Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss y hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. En: Environ Mol Mutagen. Vol.32, N° 2. 1998; p. 130-8

----- . Exposure to Benzene y Genotoxic Effects Among Filling Station Attendants. En: Epidemiol Prev,. Vol. 19, N° .62. 1995; p.105-119.

----- . Genetic Effects of Petroleum Fuels: Cytogenetic Monitoring of Gasoline Station Attendants. En: Mutation Research. Vol. 332, N°1-2 1995; p. 17-26.

CHANNARAYAPA, N y ONG, T. Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated y conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. En: Teratogenesis, Carcinogenesis y Mutagenesis. Vol.10. 1990; p. 273-279

DOLL, R y PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst.1981. p.191-308

DOMASK W. Introduction to petroleum hydrocarbons: Chemistry y composition in relation to petroleum-derived fuels y solvents. En: environmental toxicology. Vol. 8: Renal effects of petroleum hydrocarbons. 1984. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishers, p. 1-23.

DUFFAUD, F *et al.* Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subjects y cancer patients. En: Mutagenesis. Vol. 12. 1997, p. 227-231

EVANS, H. Cytological methods for detecting chemical mutagens. En: Chemical Mutagens: Principles y methods for their detection. Vol.4, New York: 1977, p. 1-29

----- . Historial perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. En: Mutation Research. 1997; p. 5-10

FARMER, Peter *et al.* Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental pollution on exogenous y oxidative DNA damage. En: Mutation Research. Vol. 544. 2003, p. 397-402

FEDERACIÓN NACIONAL DE DISTRIBUIDORES DE DERIVADOS DEL PETROLEO (FENDIPETROLEO), 2002

FELLAY, R y ORSIERE, T. Evaluation of micronucleated lymphocytes, constitutional karyotypes y anti-p53, antibodies in 21 children with various malignancies. En: Mutation Research. Vol. 404. 2000; p.155-165

FENECH, Michael. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis –blocked lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations. En: Mutation Research. Vol. 404. 1998, p. 155-165

----- . The cytokinesis-block micronucleus technique. Technologies for detection of DNA damage y mutations. New York: 1996, p. 25-35

----- . The cytokinesis-block micronucleus technique y its application to genotoxicity studies in human populations. En: Environmental Health Perspect. Vol. 101. 1995, p. 101-107

----- . The advantages y disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. En: Mutation Research. Vol. 392. 1997, p. 11-18

----- . The in vitro micronucleus technique. En:Mutation Research. Vol. 455. 2000; p. 81-95

FENECH, Michael y MORLEY, Alexyer. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. En: Mutation Research. Vol. 147. 1985, p. 29-36

----- . The effect of donor age on spontaneous y induced micronuclei. En: Mutation Research. Vol. 148. 1985, p. 99-105

----- . Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing y low dose X-irradiation. En: Mutation Research. Vol. 161. 1986, p. 193-198

FENECH, Michael *et al.* The Human Micronucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. En: Mutation Research . Vol. 428. 1999, p. 271-283

----- . HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. En: Mutation Research. Vol. 534. 2003; p.65-75

----- . Intra y Inter laboratory variation in the scoring of micronuclei y nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. En: Mutation Research. Vol. 534. 2003; p.45-64

FREDGA, *et al.* Chromosome Changes in Workers (Smokers y Nonsmokers) Exposed to Automobile Fuels y Exhaust Gases. En: Work Environ Health. 1982 Vol. 8. p. 209-221.

FOO SC. Benzene pollution from gasoline usage. En: Environ. Vol 1. 199. p.119-26

GILKA, jorge *et al.* Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. En: Received. 2000; p.1-7

HADNAGY,W. y SEEMAYER,N.H. Cytotoxic y genotoxic effects of extract of particulate emission from a gasoline-powered engine. En: Molecular Mutagenesis. Vol.12. 1988. p. 385-396.

HAGMAR L, *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. En: Cancer Res. Vol. 54. 1994. p. 2919–2922.

HAYES, R.B., *et al.* Benzene y lymphohematopoietic malignancies in China. En:. Toxicology. Environmental. Health. Vol. 61A. 2000. p. 419-432.

HEDDLE, J *et al.* Sensitivity toxico five mutagens in fanconi anemia as measured by the micronucleus method. En: Cancer Research. Vol. 38. 1978; p.2983-2988

HÖGSTEDT, Benkt. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: A method for assessment of cytogenetic damage in man. En: Mutation Research. Vol. 130. 1983, p. 63-72

HÖGSTEDT, Benkt *et al.* Gasoline pump mechanics had increased frequencies y sizes of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokweed mitogen. En: Mutation Research. Vol. 263. 1991. p. 51–55

HOYOS G, L *et al* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity; a report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. En: Mutation Research. Vol. 123. 1983, p. 61-118

HOYOS G; L. Monitoreo, Susceptibilidad y Cáncer. Popayán: Universidad del Cauca.1998, p.7-19.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (IARC). Ambient Air Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). PAH Position Paper Annexes, 2001.

----- . Occupational exposure in petroleum refining: Crude oil y major petroleum fuels. En: International Agency for Research on Cancer: “IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.” Lyon, France: IARC. 1989

----- . Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans: some industrial chemicals y dye stuff Vol.29. IARC, Lyon. 1987

----- . Diesel y gasoline engine exhausts y some nitroarenes. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Vol.46. IARC, Lyon.1982

JIA, X, Adverse effects of gasoline on the skin of exposed workers. En: Contact Dermatitis. Vol. 46, N°1. 2002. p.44-7.

JO, Wan-Kuen. Y SONG, Ki-Berm. Exposure to Volatile Organic Compounds for Individuals with Occupations Associated With Potential Exposure to Motor Vehicle Exhaust y/or Gasoline Vapor Emissions. En: The Science of the Total Environment Vol. 269, N°1-3. 2001; p. 25-37.

KARAHALIL B, KARAKAYA AE, y BURGAZ S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. En: Mutation Research. Vol. 442, N°1.1999; p.29-35

KIRSCH-VOLDERS. The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes, special issue. En: Mutation Research. 1997. p.392

LEOPARDI P., *et al.* Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. En: Environmental Molecular Mutagen. Vol. 41, N°2. 2003. p. 126-30.

LAGORIO S *et al.* Exposure to benzene of service station employees y composition of benzene. En: Med Lav. Vol. 85, N°5. 1994; p.412-421.

----- . Exposure assessment in a historical cohort of filling station attendants. En: Int J Epidemiology Vol, 22. 1993; p. 51–56

LEMASTERS GK, *et al* Comparison of internal dose measures of solvents in breath, blood y urine y genotoxic changes in aircraft maintenance personnel. En: Drug Chem Toxicol. Vol. 22, N° 1. 1999; p.181-200

LYNGE E *et al*. Risk of cancer y exposure to gasoline vapors. En: Am J Epidemiol. Vol.145, N° 5. 1997 ; p. 449-458.

MACHEFER, J; BIDRON, P, y GUIGNER PM. Exposition aux hydrocarbures benzeniques des carburants automobiles chez les mechaniciens et les pompistes. En: Arch Mal Vol.51. 1990; p.89-94

MACFARLY HN. Chronic gasoline toxicity. Proceedings of the 1st Symposium on the Toxicology of petroleum hydrocarbons. 1983; p. 78-86

MACFARLY HN, *et al*. A chronic inhalation study with unleaded gasoline vapor. En: Journal of the American College of Toxicology. Vol.3. 1984; p. 231-248

MANUALES DE OPERACIONES: Mobil, Esso, Texaco Y Terpel, 2000

MARANELLI G, *et al*. Guidelines for assessment y management of risks caused by benzene for workers at gas stations. En: Med Lav Ergon. Vol. 22, N° 3. 2000. p. 241-261.

MARCON, F. *et al*. Detection of 1cen-1q12 lesions in different phases of the cell cycle: dual colour FISH analysis of peripheral lymphocytes from subjects with occupational exposure to petroleum fuels. En: Mutagenesis. Vol. 17, N° 2. 2002; p.157-162.

MAZRIMAS, J y STETKA. Direct evidence for the role of incorporated Brdu in the induction of sister chromatid exchanges. En: Mutation Research. Vol. 11. 1978; p.23-30

MEHLMAN M.A. Dangerous properties of petroleum-refining products: Carcinogenicity of motor fuels (gasoline). En: Teratogenesis Carcinog Mutagen. Vol. 10. 1990; p. 399-408.

MUZYKA V., *et al.* Alterations of heme metabolism in lymphocytes y met al content in blood plasma as markers of diesel fuels effects on human organism. En: Environmental. Vol. 286. 2002. p. 73-81.

NILSSON RI, *et al.* Genotoxic effects in workers exposed to low levels of benzene from gasoline. En: Am J Ind Med. Vol. 30, N°3. 1996; p.317-324.

NORDLINDER, R y RAMNAS, O. Exposure to benzene at different work places in Sweden. En: Ann Occup Hyg. Vol. 31. 1987; p.345–355.

NORPPA, Hannu y M. FALCK Ghita C. ¿What do human micronuclei contain?. En: Mutagenesis. Vol. 18, N°3. 2003; p.221–233

OESCH, F., *et al.* break analysis in mononuclear blood cells of petrol pump attendants DNA single stry. En: Arch. Occup. Environ Health. Vol. 67. 1995; p. 35-39

PEACE, B y SUCCOP, p. Spontaneous micronucleus frequency y age: ¿what are normal values? En: Mutation Research. Vol. 425, N°2. 1999; p. 225-230

PERIAGO JF, ZAMBUDIO A y PRADO C. Evaluation of environmental levels of aromatic hydrocarbons in gasoline service stations by gas chromatography. En: Chromatogr A. Vol. 778, N°1-2. 1997; p.263-268

PERIAGO JF, y PRADO C. Evolution of Occupational Exposure to Environmental Levels of Aromatic Hydrocarbons in Service Stations. En:Occup.2005

PINCU, M y NORMAN, A. a improved micronuclei assay in lymphocytes. En: Mutation Research. Vol. 139. 1984; p.61-65

PITARQUE, M *et al* No increase in micronuclei frequency in cultured blood lymphocytes from a group of filling station attendants En: Mutation Research. Vol. 367, N° 3 1996; p.161-167

----- . SCE Analysis in Peripheral Blood Lymphocytes of a Group of Filling Station Attendants. En: Mutation Research. Vol. 390. 1997; p. 153–159.



PELLACK-W. y J.L. B. DNA damage in L5178YS cells following exposure to benzene metabolites. En: Mol. Pharmacol. Vol. 30.1986. p. 42-47.

POKLIS A. Death resulting from gasoline “sniffing”: A case report. En: J Forensic Sci Soc. Vol. 16. 1976; p. 43-46.

POTT, Percival. Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the serotum (etc.), Hawes, Clarke y Collins, London: 1775, p. 63-68.

RITCHIE, GD. *et al.* A review of the neurotoxicity risk of selected hydrocarbon fuels. En: Toxicol Environmental health. Vol. 4 N<sup>a</sup> 3. 2001. p. 223-312

RUDD, N; *et al.* Micronucleus assay in human fibroblasts: a measure of spontaneous chromosomal instability y mutagen hypersensitivity. En: Environmental Molecular Mutagenesis. Vol.12. 1988; p. 3-13

SANTOS-MELLO, R. y CAVALCANTE, B. Cytogenetic Studies on Gas Station Attendants. En: Mutation Research. Vol. 280, N<sup>o</sup>4. 1992; p.285-290.

STYEVEN, AM y GOLDSWORTHY, TL. Promotion of neoplastic lesions y induction of CYP2B induced by unleaded gasoline vapors in female B6C3F<sub>1</sub> mouse liver. En: Carcinogenesis. Vol. 14. 1993; p. 2137-2141

SURRALES, J. *et al.* The effect of cytochalasin B concentration on the frequency of micronuclei induced by four styard mutagens. En: Mutagenesis. Vol. 9. 1994; p. 347-353

THE AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, petroleum HPV testing group. Gasoline Blending Streams Test Plan. 2001

TOMATIS, L. Simposio internacional sobre prevención del cáncer ocupacional. Barcelona: 1988

TOMPA, A.; MAJOR, J. y JAKAB, M. Monitoring of benzene-exposed workers for genotoxic effects of benzene: improved working-condition related decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. En: Mutation Research. Vol. 304. 1994; p.164-165

TURKEL, B. y EGELI, U. Analysis of chromosomal aberrations in shoe workers exposed long term to benzene. En: Occup. Environ. Med. Vol. 51. 1994; p. 50-53

VERMA, Y y RANA, S.V. Biological monitoring of exposure to benzene in petrol pump workers y dry cleaners. En: Ind. Health, Vol. 39. 2001; p. 330-333.

WHORTON, Jr y B, Elbert. Parametric Statistical Methods y Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments: The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, 1.981

WONG, *et al.* Health effects of gasoline exposure. Mortality patterns of distribution workers in the United States. En: Environmental Health Perspect. Vol. 101. 1993; p.663-676

YAGER, J *et al.* Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. En: Cancer Reserch. Vol. 50. 1990; p. 393-399

ZHANG, L., *et al.* The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. En: CRC Crit. Rev. Toxicol. Vol.32. 2002; p. 1-42.

[http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/gasolina\\_corriente.htm](http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/gasolina_corriente.htm)

<http://www.ecopetrol.com.co/especiales/catalogo/diesel.htm>

<http://www.nrdc.org/greengate/espanol/air/dieself.asp>

**ANEXOS**

**Anexo A. ENCUESTA CORTA**

**EFFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A  
COMBUSTIBLES EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO, EVALUADO  
MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS (MN), EN LA CIUDAD DE  
POPAYÁN**

# \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_

Estación de servicio \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección y teléfono de la casa \_\_\_\_\_

Sexo M \_\_\_\_\_ F \_\_\_\_\_

Fumador: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Dejó de Fumar hace años \_\_\_\_\_ meses \_\_\_\_\_

Trabaja en estaciones de servicio hace \_\_\_\_\_ años.

Consume bebidas alcohólicas, ¿cuáles?, ¿Con qué frecuencia? \_\_\_\_\_

¿Está usted bajo algún tipo de tratamiento médico: cuál? \_\_\_\_\_

Existe algún familiar con cáncer en su familia: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Padres \_\_\_\_\_ Hermanos \_\_\_\_\_ Hijos \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_

Ha sido irradiado si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_ cuanto tiempo \_\_\_\_\_

Ha sufrido de alguna enfermedad infecciosa \_\_\_\_\_

Que otros trabajos han tenido \_\_\_\_\_

**Anexo B. ENCUESTA LARGA**

**EFFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A  
COMBUSTIBLES EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO, EVALUADO  
MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS (MN), EN LA CIUDAD DE  
POPAYÁN**

Fecha \_\_\_\_\_ Lugar \_\_\_\_\_ Encuestador \_\_\_\_\_  
Código del Paciente \_\_\_\_\_ Número de la encuesta \_\_\_\_\_  
1. Expuesto \_\_\_\_\_ 2.No expuesto \_\_\_\_\_

1. Nombre: \_\_\_\_\_
2. Dirección y Teléfono residencia: \_\_\_\_\_
3. Dirección y Teléfono Estación de servicio: \_\_\_\_\_
4. Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_
5. Sexo: 1.Masculino \_\_\_\_\_ 2.Femenino \_\_\_\_\_
6. Grupo étnico: 1.Blanco\_\_ 2.Mestizo\_\_ 3.Negro\_\_ 4.Otros \_\_\_\_\_
7. Trabajo en la estación de servicios hace \_\_\_\_\_ años.
8. Fumador: 1.Si\_\_ 2.No\_\_ Dejó de Fumar hace años \_\_\_\_\_ meses \_\_\_\_\_
9. Consume bebidas alcohólicas: 1.Si\_\_ 2.No\_\_  
Cuales: 1.Ron\_\_ 2.Aguardiente\_\_ 3.Cerveza\_\_ 4.Vino\_\_ 5.Guarapo\_\_  
Combinaciones \_\_\_\_\_ 7.Otros \_\_\_\_\_
- Frecuencia: 1.Todos los días\_\_ 2.Una vez por semana\_\_ 3.Una vez por mes\_\_ 4.Casi nunca\_\_
- Está usted bajo algún tipo de tratamiento médico: 1.Si\_\_ 2.No\_\_ De que tipo: \_\_\_\_\_
- Existe algún antecedente de cáncer en su familia: 1.Si\_\_ 2.No\_\_  
1. Padres\_\_ 2.Hermanos\_\_ 3.Hijos\_\_ 4.Abuelos\_\_ 5.Otros \_\_\_\_\_ Que tipo de  
cáncer \_\_\_\_\_
- Ha sido irradiado 1.Si\_\_ 2.No\_\_ Hace cuanto tiempo \_\_\_\_\_  
Que parte del cuerpo \_\_\_\_\_
- Ha sufrido de alguna enfermedad infecciosa: 1.Si\_\_ 2.No\_\_ De que tipo \_\_\_\_\_
- Consume algún tipo de medicamento: 1.Si\_\_ 2.No\_\_ Cuales \_\_\_\_\_
- Con que frecuencia: 1. Todos los días\_\_ 2.Una vez por semana\_\_ 3.Rara vez\_\_
- Ha tenido trabajos en donde ha estado expuesto a químicos: 1.Si\_\_ 2.No\_\_  
Cuales \_\_\_\_\_ Cuanto tiempo \_\_\_\_\_
- Cuántas horas trabaja por semana en la estación de servicio: \_\_\_\_\_ Horas
- Ha notado algún efecto secundario después de su ingreso a este trabajo: 1.Si\_\_ 2.No\_\_  
Cuales: \_\_\_\_\_
- Consume frutas y vegetales: 1.Si\_\_ 2.No\_\_ Cuales \_\_\_\_\_
- Con que frecuencia: 1.Todos los días\_\_ 2.Una vez por semana\_\_ 3.Rara vez\_\_

## Anexo C. CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD DEL CAUCA



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,  
EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTC

CENTRO DE INVESTIGACIONES Y  
SERVICIOS  
DE TOXICOLOGÍA

### CONSENTIMIENTO INFORMADO MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A COMBUSTIBLES

Yo \_\_\_\_\_, mayor de edad, identificado con cedula de ciudadanía número \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, he sido informado que el grupo de investigación en toxicología genética y citogenética de la Universidad del Cauca realizará un estudio de investigación titulado **“efecto genotóxico por la exposición ocupacional a combustibles en las estaciones de servicio, evaluado mediante la prueba de micronúcleos (MN), en la ciudad de Popayán”**; en trabajadores surtidores de combustibles en estaciones de servicio, este estudio es dirigido por la profesora Luz Stella Hoyos.

**OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO.** El objetivo consiste en determinar el efecto genotóxico de los combustibles en la población de vendedores de servicios de la ciudad de Popayán, mediante la identificación de daños cromosómicos que incrementan la frecuencia de Micronúcleos (MN).

Los resultados de este estudio son de gran utilidad para motivar el diseño y ejecución de estrategias de prevención de problemas de salud por exposición ocupacional a combustibles, como implementación de medidas de higiene, empleo de protección y educación, en el marco del sistema de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Trabajo tendientes a reducir los riesgos por exposición ocupacional a agentes químicos.

**REQUERIMIENTOS Y PROCEDIMIENTO.** Yo en pleno uso de mis facultades mentales, libre y conciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que este requiere de mi lo siguiente: Contestar un cuestionario en aproximadamente 20 minutos, para suministrar información personal referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar. Si soy seleccionado para el estudio debo donar aproximadamente 2 mL de sangre tomada de la vena de mi brazo, para ser procesada en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, a la cual se le aplicará la prueba de MN según los protocolos establecidos en el grupo de investigación, para identificar deficiencias que se puedan derivar de la exposición a combustibles.

**RIESGOS DE PARTICIPACIÓN.** Los posibles riesgos que puedo sufrir son sangrados e infección en el sitio de toma de la muestra, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de muestras del brazo, y el empleo de técnicas médicamente aceptadas e implementos estériles.

También la posible pérdida de confidencialidad de la información suministrada será evitada almacenando los datos obtenidos bajo un código numérico en lugar del nombre del individuo participante. Las muestras de sangre serán codificadas, así como los datos recolectados y los resultados se darán en forma grupal. Los resultados de este estudio no serán usados para discriminación laboral, social, religiosa, política, económica u otra de cualquier índole.

Tengo claro que no se me proveerá de ninguna compensación económica.

**BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE.** Asistir a un curso de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud, por la exposición ocupacional a combustibles. Así como una motivación hacia el cambio de actitud para la prevención de riesgos a la salud por exposición ocupacional a combustibles.

**YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITO, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO.** Es este estudio serán seleccionados 20 trabajadores expuestos a combustibles y 20 personas no expuestas como grupo control, con el fin de diferenciar, al momento del análisis de los resultados, si la presencia de MN en los linfocitos de sangre periférica de los trabajadores expuestos, se relaciona con la exposición laboral a combustibles. El propósito de la investigación tiene relevancia social y científica y obedece a una problemática de salud ocupacional. Participar en este estudio supone un mínimo riesgo especial contra mi salud, por la competencia, formación integral y calidad de los investigadores responsables de la Universidad del Cauca.

**YO ENTIENDO QUE:**

- La firma de un documento de consentimiento es requerido para todas las personas participantes del estudio.
- Los procedimientos principales y alternativos de este estudio me han sido explicados en un lenguaje claro que yo pude entender.
- También se me ha informado de los riesgos y molestias que se pueden presentar durante la toma de la muestra de sangre.
- Se me ha ofrecido aclarar cualquier duda que tenga acerca de los procedimientos que se realizarán y si tengo alguna pregunta antes, durante o después del estudio, podré comunicarme con la profesora asignada que dirige el trabajo “Luz Stella Hoyos”, en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética, en la carrera 2ª # 1A-25 Barrio Caldas, Popayán, en el teléfono 8209800 ext. 2614.
- Se me ha informado que mi participación es completamente voluntaria y puedo rehusar a rehusarme a responder cualquier pregunta o detener mi participación en este, en el momento que desee, sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo.
- Si soy lastimado o presento una reacción adversa debido a mi participación en este estudio, podré contactar a las personas mencionadas, o a sus asociados, y el tratamiento médico de esta emergencia estará disponible para mí sin costo alguno.

Entiendo que las células sanguíneas y el material genético sobrantes que no sean usadas en este estudio permanecerán en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca y podrán ser usadas en futuras investigaciones. Mi nombre y otra información que me pudiese identificar no estarán disponible y no podrá ser posible su vinculación con estos especímenes. Yo entiendo que futuras investigaciones con este material podrán a ayudar a identificar individuos que estén en mayor riesgo de sufrir problemas de salud debido a ciertas características de su ADN. Entiendo que le estoy dando permiso a la Universidad del Cauca para conducir dichos estudios. También entiendo que, como mi nombre no será vinculado con los especímenes anteriormente mencionados, la profesora Luz Stella Hoyos y sus estudiantes investigadores no estarán en la posibilidad de informar a mí o mi familia si tengo algunos factores de riesgo genéticos que ellos puedan descubrir en su investigación.

Yo tengo el derecho a la privacidad, y toda la información que es obtenida en conexión con este estudio y que pueda ser identificada conmigo, permanecerá tan confidencial como sea posible. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio, que pueda ser relacionada con mi nombre, no pueden ser dados a conocer a personas diferentes a los investigadores y a mi médico. Los resultados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas sin que se dé a conocer mi nombre.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto; en consecuencia, voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico: **“efecto genotóxico por la exposición ocupacional a combustibles en las estaciones de servicio, evaluado mediante la prueba de micronúcleos (MN), en la ciudad de Popayán”**.

Fuente (Hoyos, 2003)

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo

\_\_\_\_\_  
Firma de la Directora del Proyecto

Firmado en la ciudad de \_\_\_\_\_ a los \_\_\_\_\_ días del mes \_\_\_\_\_ de 2004

