

**DAÑO GENÉTICO Y/O APOPTÓTICO INDUCIDO *IN VITRO* POR EL TÍNER
(MEZCLA DE SOLVENTES ORGÁNICOS) EN LINFOCITOS HUMANOS DE
SANGRE PERIFÉRICA, EVALUADO A TRAVÉS DEL ENSAYO COMETA
ALCALINO**

**ELIZABETH LONDOÑO VELASCO
VICTOR FERNANDO HIDALGO CERÓN**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNÉTICA
POPAYÁN
2007**

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

**DAÑO GENÉTICO Y/O APOPTÓTICO INDUCIDO *IN VITRO* POR EL TÍNER
(MEZCLA DE SOLVENTES ORGÁNICOS) EN LINFOCITOS HUMANOS DE
SANGRE PERIFÉRICA, EVALUADO A TRAVÉS DEL ENSAYO COMETA
ALCALINO**

**ELIZABETH LONDOÑO VELASCO
VICTOR FERNANDO HIDALGO CERÓN**

Trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo

**Directora
Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo**

**Asesores
Mg. Silvio Marino Carvajal**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA
POPAYÁN
2007**

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Nota de aceptación:

Firma del director
Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo

Firma del jurado
Ph.D. Nohelia Cajas Salazar

Firma del jurado
Lic. Edna Lourdes Orozco

Fecha de sustentación: Popayán, 27 de Abril del 2007

*A*l culminar esta meta, expreso mi dedicatoria a Dios por guiar mi camino, por darme salud y vida, y concederme la sabiduría para alcanzar este gran paso en mi vida.

A mi madre Gloria Isabel Cerón por su amor incondicional, sus consejos y confiar en mi en cada momento.

A mi padre Victor José Hidalgo por darme su apoyo cuando más lo necesitaba.

A mi hermana Jessica Mayely Hidalgo por ser el motivo de inspiración para alcanzar esta meta.

A Elizabeth por creer y soñar a mi lado.

A todas las personas amigos y familiares que de alguna u otra forma me apoyaron y colaboraron en la realización de este sueño.

Victor Fernando Hidalgo Cerón.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

En primer lugar deseo dedicar este triunfo a Dios todo poderoso por brindarme sabiduría y perseverancia.

A mis padres Jaime Londoño y Ana Lucia Velasco, quienes con su amor, comprensión y un gran apoyo incondicional me han ayudado a alcanzar esta meta.

A mi abuela Maria Bedón por brindarme valor, apoyo y confianza en todo momento.

A mi hermana Sandra Lucia Londoño por ser un motivo más para luchar cada día.

A Victor por siempre estar a mi lado brindandome su apoyo

Elizabeth Londoño Velasco

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por ser el guía en cada uno de nuestros pasos y darnos la oportunidad de alcanzar esta meta.

A nuestros padres por su gran apoyo y amistad.

A nuestros profesores y colegas por sus enseñanzas.

A nuestra directora de trabajo de grado, Mg. Luz Stella Hoyos, que contribuyo con sus conocimientos y por la confianza que mostró en nosotros y en este proyecto.

Al Mg. Silvio Carvajal quien con su experiencia profesional y calidad humana contribuyo desinteresadamente en el desarrollo de este proyecto.

Al doctor Michael J. Plewa (Departamento of Crop Sciences, University of Illinois) por su valiosa colaboración y asesoría estadística en la realización de este proyecto.

También expresamos nuestra más sincera gratitud a todo el grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por brindarnos su amistad, colaboración y confianza, además del apoyo técnico y la financiación para la ejecución de este proyecto.

Y a nuestros amigos por su constante motivación y confianza.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. HIPÓTESIS	26
5. ANTECEDENTES	27
5.1 ESTUDIOS DE BIOMONITOREO	27
5.2 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	29
5.3 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> EN CÉLULAS Y TEJIDOS	31
6. MARCO TEÓRICO	34
6.1 SOLVENTES ORGÁNICOS	34
6.2 EL “TÍNER”	35
6.2.1 Principales componentes del tiner	37
6.3 ENSAYO COMETA	38
6.3.1 Principio del ensayo Cometa alcalino	40
6.3.2 Parámetros de medición de los Cometas	41
6.3.3 Ventajas y aplicaciones del ensayo	42
6.4 APOPTÓISIS VS. ENSAYO COMETA	43

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

7. METODOLOGÍA	45
7.1 QUÍMICOS Y SOLVENTES	45
7.2 TIPO DE ESTUDIO	45
7.3 GRUPOS DE ESTUDIO	46
7.3.1 Grupo control negativo	46
7.3.2 Grupo experimental	46
7.3.3 Grupo control positivo	46
7.4 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LINFOCITOS	47
7.5 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD AGUDA	48
7.5.1 Selección de las dosis experimentales/ensayos preliminares	48
7.5.2 Citotoxicidad aguda	48
7.6 ENSAYO COMETA	49
7.6.1 Condiciones del ensayo	49
7.6.2 Preparación de las placas	51
7.6.3 Lisis	51
7.6.4 Desenrollamiento del ADN y Electroforesis	51
7.6.5 Coloración	52
7.6.6 Análisis de las placas al microscopio, registro y procesamiento de los datos	52
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
8. RESULTADOS	1
8.1 ENSAYOS PRELIMINARES Y PRUEBA DE CALIBRACIÓN	1

8.2 EFECTO CITOTÓXICO EN LINFOCITOS POR EXPOSICIÓN AGUDA AL TÍNER	1
8.3 DAÑO GENÉTICO EN LINFOCITOS POR EXPOSICIÓN AL TÍNER	3
8.4 EFECTO DE LA REPARACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR EXPOSICIÓN AL TÍNER, DESPUÉS DE UN PERÍODO DE RECUPERACIÓN	7
9. DISCUSIÓN	10
9.1 DE LA METODOLOGÍA	10
9.2 DE LOS RESULTADOS	12
9.2.1 Citotoxicidad aguda en linfocitos expuestos al tiner	13
9.2.2 Daño genético en linfocitos expuestos al tiner	15
9.2.3 Eficiencia de reparación del daño genético de los linfocitos expuestos al tiner, después de un período de recuperación	18
10. CONCLUSIONES	22
11. IMPACTO	78
12. RECOMENDACIONES	24
BIBLIOGRAFIA	80
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA	98

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Tipo de daño expresado como quiebre de cadena en el ADN, de acuerdo a las condiciones de pH, durante el desenrollamiento y la electroforesis	39
Cuadro 2. Descripción de cada una de las variables	47
Cuadro 3. Diseño experimental del estudio: prueba de citotoxicidad y ensayo cometa	55

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Protocolo esquemático del ensayo cometa	40
Figura 2. Microfotografía de linfocitos tratados con tíner a 400x, muestra la clasificación visual de la morfología de los núcleos: a) sin daño en el ADN, b) daño bajo, c) daño medio, d) daño alto, e) daño total y f) daño apoptótico.	41
Figura 3. Imagen digitalizada de un cometa.	42
Figura 4. Programa de tratamiento para la prueba de citotoxicidad aguda: Fase S	49
Figura 5. Programa de tratamiento para evaluar el daño genético mediante el ensayo cometa sin y con período de recuperación: Fase S	50
Figura 6. Diseño esquemático del registro de células por dosis (tratamiento), para la evaluación del daño genético en el ensayo cometa	53
Figura 7. Citotoxicidad aguda en linfocitos humanos. Porcentaje de viabilidad después de 4 horas de exposición <i>in vitro</i> al tíner	57
Figura 8. Valores promedio de momento de cola (A) y porcentaje de ADN en la cola (B) inducidos por el tíner en linfocitos humanos cultivados <i>in vitro</i>	59
Figura 9. Estimación curvilínea del daño genético evaluado mediante el momento de cola (A) y porcentaje de ADN en la cola (B), en linfocitos de sangre periférica inducido <i>in vitro</i> por el tíner	60
Figura 10. Vista panorámica de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i> con tíner (200X), y coloreados con Bromuro de Etídio (2 μ g/mL)	61
Figura 11. Morfología del cometa (linfocito). A) Linfocito tratado, sin daño genético. B) Linfocito tratado, con daño genético bajo. C) Linfocito tratado, con daño genético alto	61

Figura 12. Comportamiento de los valores promedio de momento de cola (A) y de porcentaje de ADN en la cola (B), en linfocitos humanos tratados *in vitro* con tiner, sin y con período de recuperación de 4 horas

63

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Componentes del Tíner según ECOPETROL, analizados por cromatografía de gases mediante la prueba del PIANO	37
Tabla 2. Viabilidad celular (%) de linfocitos humanos expuestos <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones de tíner. Se reporta el resultado obtenido en 5 repeticiones, con su respectiva media (\bar{X}) y su error estándar (EE)	57
Tabla 3. Daño genético inducido por el tíner en linfocitos humanos cultivados <i>in vitro</i> , evaluado a través del ensayo cometa	58
Tabla 4. Efecto de la recuperación en función a la reparación del daño en el ADN en linfocitos humanos, inducido <i>in vitro</i> por el tíner	62

RESUMEN

El tñner es la mezcla de solventes orgánicos más común y frecuentemente empleada entre los trabajadores del sector no formal de la industria colombiana. Como mezcla compleja contiene tolueno, xileno, hexano, etilbenceno, entre otros solventes todos ellos tñnicos para el organismo. Algunos estudios han revelado datos acerca del efecto oxidativo inducido por la inhalaci3n de tñner, tales como la activaci3n de radicales libres, disminuci3n de antioxidantes, y peroxidaci3n de lĩpidos y proteĩnas. No obstante, el efecto del tñner sobre el ADN ha sido poco estudiado. Por consiguiente, el objetivo del presente estudio fue evaluar la citotoxicidad y el daño genético y/o apopt3tico inducido *in vitro* por el tñner en linfocitos humanos. La citotoxicidad aguda se determin3 mediante el análisis de la viabilidad celular con el colorante de exclusi3n azul de tripano, despu3s de 4 h de tratamiento con tñner en concentraciones de 0,025 a 1,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$. El daño genético y/o apopt3tico se evalu3 en cultivos tratados durante 1 h con tñner en concentraciones de 0,050; 0,100 y 0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mediante la aplicaci3n del ensayo Cometa ($\text{pH}>13$) antes y despu3s de un perĩodo de recuperaci3n lĩquida de 4 h. Lo que permiti3 identificar si el daño genético observado en el ensayo Cometa es reparable o es debido a una fragmentaci3n nuclear irreparable (apopt3sis). Los parámetros de evaluaci3n del daño genético fueron: momento de cola (μm) y porcentaje de ADN en la cola (%). Los resultados de citotoxicidad aguda mostraron una disminuci3n en la viabilidad de los linfocitos, presentando un efecto dependiente de la dosis ($R^2=0.927$, $P<0.001$), con porcentajes de viabilidad que oscilan entre 92,5 a 66,0%. En el ensayo Cometa, antes del perĩodo de recuperaci3n, se evidenci3 un incremento significativo ($P<0.001$) del daño en el ADN de linfocitos, observado en cultivos tratados con tñner, con respecto al control negativo (DMSO). Despu3s del perĩodo de recuperaci3n, se evidenci3 una reducci3n significativa ($P<0.05$) del daño, por efecto de la reparaci3n de lesiones primarias. Los cultivos tratados a dosis altas de tñner (0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) fueron los que mostraron mayor daño en el ADN (con promedios \pm EE de $38,2 \pm 3,3 \mu\text{m}$, $P<0.001$; y $34,7 \pm 1,8 \%$, $P<0.001$), y a su vez una eficiente reparaci3n del daño (con promedios \pm EE de $20.31 \pm 2,04 \mu\text{m}$, $P<0.001$; y $23.05 \pm 0,88\%$, $P=0.002$). Lo anterior demuestra que las lesiones producidas por el tñner son reparadas eficientemente. Por lo tanto, la migraci3n del ADN de los nũcleos despu3s de la electroforesis, es el resultado de un daño genot3xico, expresado como quiebres de cadena. En conclusi3n, los componentes del tñner inducen citotoxicidad y daño genético en linfocitos humanos bajo las condiciones dadas en este estudio, posiblemente por procesos de oxidaci3n o alquilaci3n del material genético. Lo que alerta sobre el posible daño genético que pueden estar experimentando sujetos expuestos ocupacionalmente de manera continua y constante a este tipo de mezcla de solventes, y el riesgo de desarrollar problemas de salud como el cãncer. Sin embargo, el papel del estr3s oxidativo o de agentes alquilantes en los efectos tñnicos de tñner, aun requiere ser clarificado.

Palabras claves: tñner, *in vitro*, daño genético, daño apopt3tico, ensayo Cometa.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

INTRODUCCION

La existencia de muchos estudios asociados con los efectos por exposición ocupacional a solventes orgánicos comunes, reflejan el interés de la comunidad científica frente a esta problemática; sin embargo, dichos estudios se han enfatizado en su mayoría a la evaluación de los efectos tóxicos, sobre todo a nivel neurotóxico, evidenciando de este modo la escasa información disponible con relación a la acción de los solventes sobre el material genético y sus efectos a largo plazo (genotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos).

Consecuentemente, este estudio busca optimizar mediante un modelo *in vitro* la evaluación de dichos solventes, en este caso el “tíner”, considerado como el solvente más empleado por muchos trabajadores en su actividad laboral; y en algunos casos es usado como sustancia alucinógena entre niños y jóvenes de la calle [114]. La composición del tíner está representada cuantitativamente por una gran variedad de solventes como el tolueno, el xileno, el etilbenceno, el hexano entre otros, que potencializan o retardan los efectos de los compuestos sobre los que actúan. Se debe tener en cuenta que debido a la composición, propiedades fisicoquímicas y fácil penetración de los solventes al organismo, a través de las vías respiratoria y/o dérmica, por exposición prolongada a sus vapores o por absorción cutánea, respectivamente, estos pueden llegar a interactuar con el material genético ejerciendo un efecto dañino sobre el mismo.

De hecho, la inhalación de tíner causa efectos tóxicos en una gran variedad de órganos, principalmente en el sistema nervioso central; además algunos estudios han mostrado al estrés oxidativo (activación de radicales libres, disminución de antioxidantes, y oxidación de proteínas y lípidos) como el posible mecanismo de daño tisular en individuos y animales expuestos [110]; presentando de este modo un factor de riesgo a nivel ambiental y de salud en personas que emplean este tipo de solventes sin las mínimas medidas de seguridad y protección industrial.

El diseño experimental del estudio consistió en exponer *in vitro* linfocitos de sangre periférica, procedentes de un donante sano (no expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos y no fumador) a diferentes dosis de tíner. El estudio se realizó a partir del establecimiento de dos pruebas experimentales, una prueba para determinar la citotoxicidad aguda de células en cultivo tratadas con tíner y su posterior registro de viabilidad, mediante el método de exclusión celular con azul de tripano; y una prueba para evaluar el daño en el ADN, por medio del ensayo Cometa alcalino [159], la cual permite bajo condiciones alcalinas (pH >13) detectar lesiones primarias como quiebres de cadena simple o doble en el ADN, sitios lábiles al álcali y/o aductos, generados por efecto directo del tíner sobre el material genético. Para identificar, si el daño en el ADN observado mediante el ensayo

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Cometa es reparable o es debido a una fragmentación nuclear irreparable (apoptosis), se sometieron un grupo de células tratadas en cultivo a un período de recuperación líquida; hipotetizando que aquellas células con daño genotóxico pueden reparar su ADN genómico, mientras que las células apoptóticas no pueden revertir la fragmentación nuclear.

La aplicación de estas pruebas permitió cumplir con el objetivo de evaluar el efecto directo del tiner sobre el material genético de linfocitos humanos. Lo que alerta del posible daño genético que pueden estar experimentando sujetos expuestos a este tipo de mezclas de solventes, y el riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer, en poblaciones humanas expuestas ocupacionalmente al tiner.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial tanto en países desarrollados, como en aquellos en vías de desarrollo, y esta situación se debe en parte a la creciente exposición a carcinógenos, como los solventes orgánicos u otros tipos de agentes tóxicos ambientales/ocupacionales, con potencial efecto genotóxico (mutagénico, carcinogénico). Sin embargo, la proporción de casos de cáncer atribuibles a la exposición ocupacional, no logra ser determinada con exactitud, debido a las limitaciones encontradas sobre el conocimiento de la magnitud, duración y distribución de las exposiciones a carcinógenos específicos en una población. A pesar de lo anterior, se ha logrado estimar que en la actualidad del 1 al 20% de los casos de cáncer están directamente relacionados con la exposición ambiental/ocupacional [111].

El uso de solventes orgánicos, como xileno, tolueno, tiner, varsol, y otras mezclas de solventes, ha predominado en aquellas industrias que presentan un alto riesgo carcinogénico, tales como fabricación de muebles, fabricación y uso de pinturas, manufactura de botas y zapatos, industrias gráficas, petroquímicas, entre otras [84, 85, 93, 154]. En el mundo existen miles de trabajadores empleados en la fabricación de pinturas y millones de personas son pintores. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, IARC [86] existe “suficiente evidencia de carcinogenicidad entre pintores, pero no hay suficiente evidencia de carcinogenicidad en los fabricantes de pinturas”. La población en mayor riesgo de cáncer son los pintores, de hecho, en ellos existe un 20% de riesgo de padecer cáncer en general, con un 40% de padecer cáncer de pulmón [86].

En Colombia, de acuerdo con el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE), es preocupante el incremento en la incidencia y mortalidad por cáncer durante las últimas décadas, pues, en 1960 la mortalidad por cáncer ocupaba el quinto lugar y correspondía al 3,7% del total de muertes, mientras que para el año 2000 se ocupó un tercer lugar con el 14,6% de las muertes [82]. Sin embargo, la estimación estadística de cáncer por exposición ocupacional no es la más exacta ni veraz, debido a que muchas empresas no reportan estos casos de cáncer. En general no se dispone de cálculos fiables sobre la carga que genera el cáncer ocupacional, ni sobre el grado de exposición de los carcinógenos en los lugares de trabajo [103]. Cálculos hechos para 1993, estiman en más de dos y medio millones el número de personas que utilizan solventes orgánicos en Colombia [134], denotando que el número de trabajadores expuestos actualmente es aún mayor.

La exposición a solventes orgánicos representa una amenaza potencial para la salud, la productividad y la eficiencia tanto para los trabajadores que los emplean en múltiples procesos industriales [134], como para la población general que los utilizan en diversas actividades domésticas, y en algunos casos es usado incluso como sustancia alucinógena entre niños y jóvenes de la calle [114].

Esta problemática de exposición a solventes orgánicos se hace más preocupante debido a que los trabajadores no se encuentran expuestos en forma aislada a un sólo solvente, como el benceno, tolueno, metanol, acetonas entre otros; sino que se encuentran expuestos a varios solventes, y en algunos casos a mezclas complejas que ellos mismos preparan o que encuentran en el comercio como el tiner. Es bien conocido que la exposición a diferentes agentes químicos puede presentar efectos aditivos, sinérgicos o potenciadores [68] sobre el desarrollo de problemas de salud (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos). Como ya se nombró antes, el oficio de pintor ha sido clasificado como carcinogénico por la IARC [86], pero uno de los problemas de estos estudios realizados con varios solventes orgánicos es la inexistencia de una firme evidencia de cual es el agente o agentes específicos causantes del cáncer, lo cual posiblemente se deba a que están expuestos a una multitud de carcinógenos, tales como asbestos, metales, pigmentos, solventes, gasolina e hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros [106].

Algunos estudios de biomonitoreo genético han logrado evidenciar una asociación entre el daño citogenético y la exposición ocupacional a solventes orgánicos [78, 90, 135, 137, 166, 167, 187], así como un alto riesgo de carcinogenicidad, entre los que se destacan el cáncer de pulmón, hígado, riñón, cavidad oral, esófago, próstata, vejiga, linfomas y leucemias [2, 17, 20, 105, 106, 126, 144]. Otros estudios han reportado el efecto genotóxico de los solventes orgánicos, como el realizado por Hoyos en el 2003 con pintores de carros y entonadores de pintura de la ciudad de Popayán, los cuales registraron un aumento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas en linfocitos de personas expuestas, con respecto al grupo referente; y el estudio realizado por Pitarque en el 2002 en trabajadores de una fábrica de zapatos, donde empleados expuestos a solventes orgánicos evidenciaron un incremento en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica. En ambos estudios se hipotetiza que la exposición responsable de la inducción del daño genético, es debido a la presencia de benceno en el tiner y en la gasolina que emplean con frecuencia en sus actividades laborales, respectivamente. De hecho, varios estudios han demostrado que el benceno es un agente genotóxico, mutagénico, embriotóxico y carcinogénico [10, 28, 83, 118, 130, 180].

El tiner es una mezcla compleja que contiene tolueno, benceno, acetona, xileno, hexano, isobutano, etilbenceno, y otras sustancias tóxicas para el hombre [78, 110]. Y aunque es la mezcla más popular y ampliamente utilizada en diferentes industrias, no ha recibido la importancia que se merece, pues presenta una gran

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

actividad biológica y persistencia en el ambiente que la hace peligrosa para la salud. De hecho, varios estudios han revelado que la inhalación de tiner causa efectos tóxicos en el cerebro, hígado, riñón, pulmón y sistema reproductivo [20, 80, 110]; e igualmente reportan que los efectos del estrés oxidativo son los posibles mecanismos de daño de tejidos en individuos y animales expuestos a vapores de tiner o de su principal componente, el tolueno [13, 22, 46, 49, 72]. Sin embargo, el efecto de la inhalación de tiner sobre el ADN no ha sido lo suficientemente estudiado.

En cuanto al frecuente empleo de tiner a nivel laboral o doméstico, éste se debe no solo a su eficacia, sino también a su accesibilidad y bajo costo; siendo esta última la razón de ser de su composición, pues su solvente activo (tolueno) tiene un costo tan elevado que resultaría casi imposible utilizarlo de forma pura. Así pues, al agregarle un diluyente (otros solventes accesorios) se aumenta el volumen y aprovechamiento del mismo, mientras que un cosolvente (benceno) mantiene su efecto y lo potencia [56].

Infortunadamente, hasta el momento la mayoría de estudios que se han realizado con relación a los solventes orgánicos se han enfatizado ampliamente en la evaluación de los efectos adversos a corto plazo, como los neurotóxicos y pulmonares; mientras que los efectos a largo plazo y de carácter genotóxico, como los mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos hasta el momento han sido poco investigados, lo cual se deduce, después de haber realizado una búsqueda cuidadosa en diferentes bases de datos disponibles en internet (Medline, Proquest, Hinari, Science direct) que evidencian la falta de estudios y referencias sobre los efectos genotóxicos. De hecho, la problemática a escala mundial en relación con la exposición a solventes se ha centralizado con mayor atención en torno al benceno (un solvente específico), el cual se considera peligroso para la salud inclusive a bajas concentraciones [74, 141].

En la ciudad de Popayán la problemática de exposición ocupacional a solventes orgánicos es preocupante, pues se demostró el uso infrecuente o incluso inexistente de elementos de protección personal, la incorrecta manipulación de los químicos y la escasa ventilación en el área en que se labora [78]. Estos hallazgos advierten sobre lo que puede estar pasando en el resto de empresas relacionadas en el país. El sector no formal de la industria colombiana por el hecho de poseer limitaciones socioeconómicas, presentar un bajo nivel de escolaridad y un desconocimiento parcial o total de los potenciales efectos a nivel humano por la exposición a solventes, agudizan esta problemática. Luego, al no adoptarse las respectivas medidas de control y prevención de los potenciales riesgos de salud ocupacional, la exposición a agentes mutagénicos y carcinógenos a nivel laboral seguirá siendo más alta en comparación a la exposición ambiental general [89].

Dado que en Popayán, la exposición ocupacional a solventes orgánicos exhibe una asociación directa con el incremento de alteraciones cromosómicas en

personas expuestas, y a que el tñner es la mezcla más empleada entre los trabajadores [78]; es interesante evaluar experimentalmente al tñner, por ser el posible responsable de los efectos genotóxicos observados en personas expuestas. Por consiguiente, este estudio respondió a los siguientes interrogantes: ¿El tñner a diferentes concentraciones induce un efecto dosis-respuesta *in vitro* en linfocitos humanos de sangre periférica a nivel citotóxico? ¿La exposición a diferentes concentraciones de tñner *in vitro* (dosis alta, media, baja) induce daño genético en linfocitos humanos de sangre periférica? ¿Después de un tiempo de recuperación *in vitro* los linfocitos humanos de sangre periférica tienen la capacidad de reparar el daño genético inducido por exposición a tñner? ¿Existirá asociación entre el daño genético y la eficiencia de reparación en los linfocitos expuestos *in vitro* a tñner, que permita identificar un daño genotóxico directo y/o fragmentación nuclear inducida por procesos apoptóticos?

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

2. JUSTIFICACIÓN

La exposición ocupacional a los solventes orgánicos es un preocupante problema de salud pública. Estudios de biomonitorio realizados con trabajadores expuestos a una variedad de solventes orgánicos han evidenciado una asociación entre el daño citogenético y la exposición ocupacional [78, 90, 135, 137, 166, 167, 187], revelando que la exposición crónica a estos compuestos en bajas dosis, es suficiente para incrementar la frecuencia de daños cromosómicos en linfocitos humanos de sangre periférica, y según Bonassi [19] relacionarse con un mayor riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer.

Desde el punto de vista de la medicina ocupacional la exposición más común en el lugar de trabajo es a las mezclas complejas de solventes orgánicos y no tanto a las exposiciones aisladas a un solo solvente [20], constituyéndose en el verdadero escenario de exposición al cual están sometidos los trabajadores cotidianamente. De ahí que se requiera estudiar e investigar más a fondo este tipo de mezclas complejas, cuya composición exhibe la presencia de agentes carcinogénicos, y donde la genotoxicidad no puede ser excluida como el posible mecanismo de carcinogenicidad.

Colombia por ser un país en vía de desarrollo, abundan pequeñas industrias que dentro de su actividad económica y laboral manejan este tipo de compuestos orgánicos para la fabricación de pinturas, lacas, barnices, tintas para impresión, recubrimiento y acabado de superficies, fabricación de muebles, entonadores de pinturas, pintores, carpinteros y zapateros, entre otros. Los resultados obtenidos en este estudio involucran directamente a este sector importante de la economía regional y nacional, el cual no es conciente de la magnitud del daño que podrían estar experimentando por la prolongada exposición a mezclas complejas de solventes como el tiner.

Los solventes orgánicos como agentes simples han sido ampliamente estudiados para evaluar la carcinogenicidad en animales experimentales. En contraste, hay pocos estudios disponibles sobre mezclas de solventes [106]. En el caso del tiner, su multicomposición esta determinada por los hidrocarburos alifáticos, aromáticos, cetonas y alcoholes; resaltando que entre los dos primeros compuestos hay suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales experimentales, siendo el hígado el órgano blanco de la mayoría estos compuestos. El etilbenceno, componente del tiner, incrementa los índices de neoplasias renales y adenomas testiculares al ser evaluado por inhalación en ratas macho [122], mientras que otros solventes como el xileno y el tolueno únicamente evidenciaron carcinogenicidad a altas concentraciones [113]. Maltoni *et al.* [108] reporta que el

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

tolueno induce leucemia y linfomas en ratas. Con respecto a la genotoxicidad, se ha logrado determinar el efecto clastogénico del tolueno como inductor de micronúcleos entre eritrocitos policromáticos de medula ósea en ratones [115]. Sin embargo, existen ciertos estudios contradictorios relacionados con la genotoxicidad de estos compuestos, tanto a nivel *ex vivo* como *in vivo* e *in vitro* [64, 91, 136, 138, 145, 148, 163, 183].

Como ya fue mencionado antes, algunos estudios de biomonitorio han evidenciado el potencial genotóxico de los solventes orgánicos, mostrando un incremento significativo en la frecuencia de AC's, ICH's y Mn's en poblaciones expuestas ocupacionalmente [1, 135, 137]. Dichos resultados, han proporcionado nuevas hipótesis y conceptos con relación al efecto de los solventes sobre el ADN, hipótesis que pueden confirmarse o rechazarse mediante una verificación experimental; creando de esta forma nuevas e importantes conexiones entre la epidemiología humana y la toxicología experimental [170]. Luego, es interesante experimentar con la aplicación de pruebas tan novedosas como el ensayo Cometa *in vitro*, que permite identificar la interacción y alteración del material genético, equivalentes a daños o lesiones en la cadena del ADN, generados por agentes químicos.

De ahí, que la finalidad de esta investigación fue la de realizar un estudio experimental *in vitro* para evaluar el daño genético y/o apoptótico inducido por exposición al tiner en linfocitos humanos de sangre periférica, la cual permitirá sustentar la hipótesis establecida por Hoyos [78] sobre el posible efecto de esta mezcla compleja en el material genético de personas expuestas ocupacionalmente a la misma. El tiner por ser una mezcla de solventes puede considerarse como una sustancia peligrosa en personas expuestas debido a los efectos aditivos, potenciadores y sinérgicos que podría presentar la mezcla resultante [68]. Sin embargo faltan estudios que evidencien el posible daño en el ADN inducido por el tiner, sobre todo a nivel *in vitro*.

Por consiguiente, el presente estudio permite evaluar el efecto genotóxico del tiner a nivel *in vitro*, controlando variables tales como la temperatura de incubación, la dosis a evaluar y el tiempo de exposición, condiciones del estudio que permiten reducir el número de variables y eliminar los factores de confusión tales como el consumo de alcohol y cigarrillo (variables desconcertantes) propios de los estudios de monitoreo genético en poblaciones ocupacionalmente expuestas. El uso de un método *in vitro* es conveniente, debido a que el empleo de métodos de ensayo tradicionales con animales sería muy costoso en cuanto a tiempo y dinero; además de que se plantea un dilema ético debido a una creciente preocupación pública acerca del empleo de animales en ensayos de laboratorio.

Por otro lado, existen interrogantes acerca de la confiabilidad de los datos obtenidos en animales para predecir los efectos tóxicos de nuevos químicos en humanos, por las diferencias interespecies que hacen a la extrapolación incierta

[16]. De hecho, una ventaja significativa de los métodos *in vitro* es la de poder usar células provenientes de humanos como los linfocitos evitando así, el uso de extrapolación interespecies [43, 53], además de ser las células ideales para detectar daños generados por agentes genotóxicos a bajas dosis y poseer una gran actividad inmunológica que les da una mayor sensibilidad frente a este tipo de exposición. Así pues, ciertos estudios han empleado los linfocitos aislados como células blanco, al permitir expresar efectos genotóxicos después de una exposición *in vitro* a solventes orgánicos en diferentes dosis [6, 168]. Finalmente, las pruebas *in vitro* permiten identificar los efectos celulares específicos y proveen un medio rápido y efectivo para evaluar el potencial genotóxico de químicos [112].

El estrés oxidativo esta frecuentemente referenciado como una causa principal o secundaria en la patogénesis de un número de enfermedades que involucran casi todos los tejidos y órganos, como lo es el cáncer. Actualmente, un gran número de datos soportan la hipótesis de que el estrés oxidativo cumple un papel importante en los efectos biológicos causados por los solventes orgánicos, como la formación de aductos y la pérdida espontánea de bases nitrogenadas en el ADN, que generan sitiosapurínicos o apirimidínicos [39, 63, 100, 106, 110].

La electroforesis alcalina de células individuales en gel o “ensayo Cometa alcalino”, se considera como una buena alternativa para la cuantificación de lesiones primarias (como quiebres de cadena simple y/o doble en el ADN, sitios lábiles al álcali, sitios de reparación por escisión de bases incompleta, y aductos), generadas por el efecto directo de los componentes del tóxico o de sus metabolitos sobre el material genético. El ensayo Cometa se caracteriza por ser una prueba citogenética molecular de alta sensibilidad para detectar y cuantificar niveles bajos de daño en el ADN [171], permite evaluar la totalidad del genoma, e identifica posibles mutágenos y carcinógenos humanos [4]. Además, esta prueba es ventajosa porque requiere de pocas células por muestra, es fácil de desarrollar y permite una rápida obtención de resultados. Es importante mencionar que las condiciones experimentales *in vitro* del ensayo Cometa cuentan con unas directrices o un protocolo unificado y establecido internacionalmente, para su eficaz aplicación en toxicología genética [171].

El ensayo Cometa se basa en la migración de ADN, después de la electroforesis, como resultado de un daño genotóxico en células individuales. Esta migración permite observar una imagen con la apariencia de un “Cometa”, identificando una cabeza intensamente brillante, y una prolongación equivalente a una cola, cuya longitud e intensidad estarán relacionadas con la cantidad de rupturas de cadena de ADN. Una crítica a esta prueba, se basa en el hecho de que algunos o todos los Cometas observados pueden ser resultado de estadios tempranos de apoptosis, provocando de esta manera falsos positivos [30]. Sin embargo, la metodología aplicada para este estudio permitirá diferenciar las células apoptóticas de las células con daño en el ADN, en base a su habilidad para reparar el ADN durante un período de recuperación líquida. Cuando una célula

comienza la fragmentación del ADN en la apoptosis (cuerpos apoptóticos), el núcleo no se reensamblará bajo ninguna condición, a diferencia de las células que presentan un daño genético reparable (genotóxico) [150]. Permitiendo de este modo valorar y evidenciar la efectividad del ensayo Cometa, como prueba de genotoxicidad y descartar un daño apoptótico inducido por el tiner.

Este trabajo constituye un interesante aporte a la información científica hasta ahora conocida sobre mezclas complejas de solventes, permitiendo la adopción de ideas y planteamientos sobre el posible daño directo al ADN inducido por este tipo de sustancias. De este modo, el estudio contribuye no solo un aporte a nivel científico sino también a la comunidad en general, pues son muchas las personas expuestas a solventes orgánicos que requieren de una apropiada concientización sobre los riesgos de la inadecuada manipulación, y motivar hacia la prevención de riesgos ocupacionales. Además de permitir reportar la alta sensibilidad del ensayo Cometa y su utilidad como una herramienta en estudios de sustancias genotóxicas y/o carcinogénicas.

Este estudio se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, pues este consta de una adecuada infraestructura, equipos, materiales, suministros y personal capacitado que permitieron llevar a cabo satisfactoriamente dicho proyecto, garantizando la confiabilidad de los resultados e incrementando la validez del estudio.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño genético y/o apoptótico inducido *in vitro* por el tiner (mezcla compleja de solventes orgánicos) en linfocitos humanos de sangre periférica, por medio del ensayo Cometa alcalino o electroforesis de células individuales en gel de agarosa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la citotoxicidad aguda para establecer una relación dosis-efecto en linfocitos de sangre periférica tratados *in vitro* con tiner.

Evaluar el daño genético en linfocitos tratados *in vitro*, con tiner mediante el ensayo Cometa alcalino.

Evaluar la eficiencia de reparación *in vitro* del daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica tratados con tiner, después de ser sometidos a un período de recuperación.

Asociar el daño genético y la eficiencia de reparación, con el propósito de determinar cuantitativamente si el daño en el ADN de linfocitos inducido por exposición *in vitro* a tiner, es el resultado de un efecto genotóxico o de un efecto citotóxico apoptótico.

4. HIPÓTESIS

Si el tratamiento de linfocitos humanos *in vitro* con tiner induce citotoxicidad aguda, se espera que haya una asociación negativa estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones de tiner evaluadas y el número promedio de linfocitos vivos, es decir, un porcentaje de viabilidad celular dosis – dependiente. De lo contrario, no habrá asociación entre las concentraciones administradas y el porcentaje de viabilidad celular.

Si los linfocitos humanos presentan una respuesta genotóxica inducida por el tiner, se espera que exista una relación dosis dependiente entre las concentraciones de tiner (alta, media y baja) y el daño genético, expresado como migración del ADN por el ensayo Cometa y evaluado mediante los parámetros de momento de cola (TM) y porcentaje de ADN en la cola (%ADNT). También, se espera que los valores promedio de daño genético evaluados en células tratadas con tiner, presenten una diferencia estadísticamente significativa, con respecto al control negativo. De lo contrario no habrá diferencia significativa entre células tratadas con tiner y el control negativo.

Si los linfocitos tratados presentan una recuperación significativa del daño genotóxico inducido por el tiner, debido a la reparación del ADN, se espera que los valores promedio de los parámetros de genotoxicidad evaluados (TM y %DNA) en linfocitos tratados y sometidos a un período de recuperación (con), expresen una reducción significativa del daño genético, con respecto a los linfocitos tratados y no sometidos a un período de recuperación (sin). De lo contrario, los valores de genotoxicidad evaluados con un período de recuperación, serán mayores o incluso iguales a los valores evaluados sin recuperación; y por lo tanto el daño observado se asociará con procesos apoptóticos no reparables.

5. ANTECEDENTES

La literatura reporta pocos estudios realizados a partir del daño genético inducido por los solventes orgánicos tanto *in vitro* como *in vivo* o *ex vivo*, empleando el ensayo Cometa. Sin embargo una revisión exhaustiva realizada en diversas bases de datos como Medline, Science direct, Hinari y Proquest permitió encontrar algunas evidencias científicas que soportan el posible efecto citotóxico y/o genotóxico del tiner a partir de los efectos generados por otros solventes orgánicos de características o composición similar, empleando diferentes pruebas citogenéticas como micronúcleos (Mn's), intercambio de cromátides hermanas (ICH's), alteraciones cromosómicas (AC's) e incluso el ensayo Cometa.

5.1 ESTUDIOS DE BIOMONITOREO

Debido a que nuestra hipótesis parte de un estudio de biomonitorio, es necesario citar otros estudios que permitan establecer una relación entre la exposición ocupacional a los solventes orgánicos y el daño citogenético de los mismos en células humanas. Tal es el caso del estudio realizado por Pinto y colaboradores en el 2000 [135], donde mediante un estudio de monitoreo cross-sectional con pintores de edificios, se evaluó la exposición a solventes orgánicos con los biomarcadores alteraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y micronúcleos, encontrando un incremento significativo en la frecuencia de AC's e ICH's en linfocitos y Mn's en células bucales, asociado con el tiempo de exposición ocupacional, lo cual indica que la exposición crónica a bajas dosis de estos químicos fue suficiente para incrementar la frecuencia de daños cromosómicos.

En el 2001 Zhu y colaboradores [187], dan a conocer mediante un estudio de biomonitorio que hombres y mujeres trabajadores en una planta de manufactura de buses, presentan un incremento significativo en los valores de momento de cola (TM) medido a través del ensayo Cometa (pH>13), el efecto genotóxico probablemente se debe a la coexposición al benceno, tolueno y xileno, a los que se ven expuestos en sus labores como pintores, trabajadores auxiliares y mecánicos, en comparación a los administradores que actuaron como grupo referente. También se observó un incremento en el TM en los fumadores (>1cigarillo al día) comparado con los no fumadores. En cuanto a la edad, género y consumo de alcohol (cantidad no especificada) no hubo un efecto en el TM.

Un estudio realizado por Iravathy y colaboradores [90] permitió evaluar la exposición ocupacional a compuestos orgánicos volátiles (1,1 bifenil, estirenos, propilbenceno, PAH's nitrados), ozono y dióxido de nitrógeno en personas trabajadoras con maquinas fotocopiadoras; usando como biomarcador el ensayo Cometa alcalino se reportó un incremento significativo en el daño del ADN basal y una disminución en la eficiencia de reparación del daño en las personas expuestas con respecto a los referentes. Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en el daño del ADN basal entre fumadores y no fumadores, tanto en el grupo referente como en el expuesto.

La exposición ocupacional al benceno contenido en solventes orgánicos, se analizó aplicando como biomarcador el ensayo Cometa en linfocitos T/B y granulocitos de personas trabajadoras en una empresa de impresiones, encontrando un incremento en los valores de porcentaje de ADN en la cola (%TDNA), momento de cola (TM) y momento de cola Olive de los tres tipos de células de los trabajadores expuestos, con respecto a los referentes. El fumar (aprox. 14 cigarrillos por día) y la edad no correlacionaron con el daño al ADN. El patrón de momento de cola fue diferente entre los linfocitos T/B y los granulocitos [166].

Un estudio de biomonitorio realizado en Bulgaria con mujeres trabajadoras en una fábrica de zapatos, permitió evaluar la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos, así como los quiebres de cadena en el ADN mediante el ensayo Cometa, por exposición ocupacional a solventes orgánicos (tolueno, gasolina, acetona, etilacetato y metilenedifenil disocianato), encontrando un incremento altamente significativo estadísticamente en la frecuencia de micronúcleos de linfocitos binucleados en comparación al grupo referente. En contraste no hubo diferencia entre los expuestos y los referentes en el análisis de ICH's, ni mediante la aplicación del ensayo Cometa [136, 137].

En el año 2003, Hoyos [78] llevó a cabo un importante estudio de tipo cross sectional, donde dio a conocer la posible genotoxicidad del tiner por ser el solvente más empleado entre pintores de carros y entonadores de pinturas de la ciudad de Popayán, ya que se reportó un incremento altamente significativo en la frecuencia de AC's en linfocitos de sangre periférica de trabajadores expuestos, con respecto al grupo referente. El tiempo de exposición a nivel del grupo de expuestos no mostró influencia estadísticamente significativa en la frecuencia de AC's.

Un estudio que estima el riesgo genotóxico de la exposición al tolueno, xileno y benceno contenidos en los pegantes fue el realizado por Çok *et al*, [32], donde evalúa el daño del ADN en linfocitos de sangre periférica de 20 adolescentes masculinos inhaladores de pegantes, usando el ensayo Cometa alcalino. Mediante un registro cualitativo de los Cometas (categoría de daño), se observó un incremento estadísticamente significativo del daño genético entre el grupo

expuesto y el control. Sin embargo no hubo una diferencia significativa del daño genético entre fumadores y no fumadores del grupo expuesto, este efecto no significativo puede atribuirse al moderado hábito de fumar y al pequeño tamaño de muestra en el estudio. Tampoco existió una relación entre el daño al ADN y el tiempo de exposición. Las tasas de excreción de ácido hipúrico y o-cresol en la orina, fueron usadas como un marcador de exposición al tolueno, siendo respectivamente 73 y 1582 veces más altos en los inhaladores de pegantes, que en el grupo control. Este estudio sugiere que el daño al ADN en linfocitos de inhaladores de pegantes es inducido por el tolueno. Pero se requieren estudios *in vitro* con el tolueno para soportar esta asunción, debido a que otros componentes de los pegamentos pueden influir de igual manera. Los resultados de este estudio expresan la posible genotoxicidad del tolueno que se puede presentar por alta exposición ocupacional, debido a que es uno de los solventes más usados no solo en industrias sino también en los hogares.

El ensayo Cometa fue aplicado para estudiar la ocurrencia del daño en el ADN (porcentaje de ADN en la cola y momento de cola) y la reparación (antes y después del turno de trabajo) en linfocitos de sangre periférica de trabajadores en industrias y minas, expuestos a bajos niveles de benceno. El análisis estadístico mostró diferencias significativas de daño genético entre los trabajadores expuestos con respecto a grupo referente. En general para el grupo expuesto los datos de genotoxicidad registrados después del turno, excedieron a los datos registrados antes del turno, lo que evidencia un proceso de reparación del daño genético entre cada turno de trabajo [167].

El daño citogenético por exposición ocupacional a solventes orgánicos en trabajadores de imprentas, se evaluó usando como biomarcadores de efecto el intercambio de cromátides hermanas (ICH's), las alteraciones cromosómicas (AC's) y los micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica de 26 sujetos (14 trabajadores expuestos, 12 referentes). La frecuencia de CA's, ICH's y MN's en trabajadores expuestos fue significativamente más alta con respecto al grupo referente. El índice de replicación (IR) no se vio afectado, mientras que el índice mitótico (IM) se vio alterado en la mayoría de los trabajadores. De este estudio, se puede concluir que la exposición ocupacional crónica a tintes para impresión y tiner, incrementa levemente el riesgo de daño genético entre trabajadores de imprentas [1]

5.2 ESTUDIOS *IN VIVO*

Se evaluaron los efectos genéticos del tiner, benceno y tolueno en *Drosophila melanogaster*, mediante el registro de la pérdida de los cromosomas sexuales y la no disyunción de los mismos en machos y hembras; y se determinó que el orden de toxicidad fue benceno>tolueno>tiner. Además, la viabilidad celular se redujo

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

con el benceno y el tolueno pero no con el tñer. Solamente las concentraciones más altas de benceno y tolueno indujeron la pérdida de cromosomas sexuales y la no disyunción en los machos. El tñer no produjo dichos efectos genéticos [148].

Los efectos genotóxicos de cinco solventes aromáticos ampliamente usados, etilbenceno, metilbenceno (tolueno), o-, m-, y p-dimetilbenceno (xileno), sobre las células de medula ósea de ratones NMRI macho se estudiaron usando la prueba de micronúcleos. Cada compuesto se aplicó a los animales por administración intraperitoneal en dos dosis similares con diferencia de 24 horas. Se incrementó la formación de micronúcleos entre los eritrocitos policromáticos de medula ósea femoral después de 30 h de la primera inyección debido al efecto clastogénico de los compuestos evaluados. De todos los químicos evaluados, solo el tolueno presentó un incremento dosis-dependiente en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados. Esta actividad genotóxica del tolueno fue confirmada en ratones macho B6C3F1 [115].

Un estudio muy interesante fue el realizado por Plappert *et al*, [138] empleando la metodología del ensayo Cometa para evaluar *in vivo* la exposición al benceno y/o tolueno. Para ello se expuso ratones BDF al benceno y/o al tolueno en cámaras de inhalación. El daño del ADN fue estudiado en células sanguíneas periféricas, de medula ósea e hígado. Cuando la exposición fue únicamente al benceno, se detectó un incremento significativo en el daño del ADN medido por los parámetros de longitud de cola, porcentaje de ADN en la cola y momento de cola, mientras que el tolueno por si solo no indujo un incremento significativo en el daño al ADN. Sin embargo, la coexposición al benceno con tolueno redujo ampliamente la genotoxicidad del benceno (alrededor de un 50%), este fenómeno se vio en los tres tipos de células evaluadas. Los resultados obtenidos consideran una clara indicación del efecto protector del tolueno sobre la genotoxicidad del benceno.

En el año 1999 el National Toxicology Program [122] realizó bioensayos con ratones y ratas de laboratorio para evaluar la carcinogenicidad del etilbenceno, y se determinó que existe evidencia de carcinogenicidad en ratas al incrementarse los índices de neoplasias renales y adenomas testiculares. En ratones se observó un incremento en los índices de neoplasias hepatocelulares. Por lo cual se concluye que el etilbenceno es carcinogénico en animales experimentales. En otro estudio *in vivo* realizado con ratas de laboratorio para evaluar la carcinogenicidad del benceno, el tolueno y el xileno, demuestra que el benceno es carcinogénico en animales experimentales, mientras que el tolueno y el xileno lo son únicamente a concentraciones altas [113].

Es conveniente mencionar que algunos estudios han determinado que la inhalación de tñer (mezcla compleja de solventes) causa daño al cerebro, riñón, hígado, pulmón, y sistema reproductor; relacionando así al estrés oxidativo como un posible mecanismo de daño en tejidos de individuos y animales expuestos a sus vapores [80, 110]. Estudios realizados con tolueno, el principal componente

del tiner, indicaron que la activación de procesos radicales libres en el cerebro aumentaron la intensidad de quimioluminiscencia [22]. También se ha observado un aumento en la peroxidación lipídica, disminución en los niveles de glutathion (GSH), y un efecto neuroprotectivo de la melatonina en el cerebro después de la exposición a tiner [13]. Mientras que en el pulmón, la inhalación del tiner causa un aumento en la peroxidación lipídica, disminución en la actividad superóxido dismutasa, y disminución en los niveles de GSH [184].

En ratas macho de 4 semanas (peso 100-120g) expuestas dos veces cada día durante 2, 4, 8, 12 y 16 semanas a tiner (tolueno, benceno, acetona, metanol y otras sustancias), se evaluó el daño genético mediante el ensayo Cometa con Fpg (Formamidopirimidina ADN glicosilasa), así como los niveles de MDA (malondialdehído) y GSH (glutathion) en cerebro e hígado. Los resultados indicaron que durante todas las semanas de exposición se presentó un daño significativo en los linfocitos de las ratas expuestas, ya que hubo un incremento estadísticamente significativo del valor de momento de cola derivado de los sitios sensibles a la enzima Fpg en el ADN de linfocitos de ratas expuestas a vapores del tiner comparado a los linfocitos de ratas control ($p < 0.05$); estos sitios pueden corresponder a sitios de daño del ADN causado por mecanismos de alquilación u oxidación. También se observó una alta correlación con el incremento de MDA y una disminución de los niveles de GSH en el cerebro y en el hígado [110].

5.3 ESTUDIOS *IN VITRO* EN CÉLULAS Y TEJIDOS

Otros estudios en donde se emplearon células meristemáticas de *Vicia faba* para la detección de alteraciones cromosómicas (AC's) e intercambio de cromátides hermanas (ICH's), han indicado que el tiner (compuesto de tolueno, 52%; n-hexano, 25.5%; etanol, 12.5%; etilacetato, 6%; isopropanol, 2.0%; benceno, 1.0%; y n-heptano, 1.0%) aplicado a diferentes concentraciones (0.003, 0.006 y 0.012%) indujo un incremento significativo en la frecuencia de AC's e ICH's. Lo cual indica que *Vicia faba* es un material biológico extremadamente sensible para la detección de daño en el ADN, y que el tiner es un agente altamente tóxico con potencial mutagénico debido al daño genético inducido a bajas concentraciones [69, 70].

Un estudio experimental con linfocitos humanos permitió evaluar a través del ensayo Cometa el daño genotóxico inducido por el benceno y cinco de sus metabolitos tales como ácido mucónico, hidroquinona, catecol, p-benzoquinona y benzenotriol. Aquí, los resultados positivos variaron dependiendo de las dosis evaluadas para cada compuesto y el tiempo de exposición (1, 2 y 4 horas de tratamiento). Cuando los tratamientos se incrementan en presencia o ausencia de S9, el benceno a dosis incrementadas 5 veces presenta una respuesta positiva significativa, lo que no ocurrió a bajas dosis. Cuando el tiempo de tratamiento aumentó a 2 y 4 horas, también hubo un incremento, y las células tratadas con

ácido mucónico, hidroquinona, catecol y benzoquinona en presencia de S9 demostraron un incremento dosis dependiente en los valores de momento de cola. Es decir, que los efectos fueron más marcados a dosis altas y después de prolongadas exposiciones. Sin embargo, estos resultados no fueron consistentes de un experimento a otro [6].

Se han realizado estudios para determinar la genotoxicidad y mutagenicidad *in vitro* de solventes como 1,2-dicloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,3-dicloropropano, 1,2,3-tricloropropano y 1,1,3-tricloropropeno en linfocitos humanos de sangre periférica usando la prueba de micronúcleos y el ensayo Cometa. Los resultados muestran que todas las sustancias evaluadas incrementan la frecuencia de Mn, ha excepción del 1,2,3-tricloropropano con y sin activación metabólica (fracción S9) y del 1,1,2-tricloroetano sin activación metabólica en los experimentos repetidos, quienes exhiben una baja significancia estadística en la actividad mutagénica comparada con el grupo control. En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo Cometa todos los químicos, valorados mediante los parámetros de momento de cola, longitud en la cola y porcentaje en la cola, indujeron quiebres de cadena en el ADN, con las diferentes dosis evaluadas en presencia y ausencia de la fracción S9. Los datos también mostraron que la sensibilidad del ADN se incrementa con el incremento en el grado de halogenación. Los resultados de este trabajo sugieren que el ensayo Cometa es el más adecuado y sensible método de evaluación de esta clase de compuestos, a diferencia de la prueba de micronúcleos [168].

En el año 1999, Zarani y colaboradores [183] realizaron un estudio *in vitro* para identificar la genotoxicidad de solventes orgánicos en cultivos de sangre total después del tratamiento con tolueno, benceno y acetona. Para ello se aplicó la prueba de micronúcleos y tratamientos a diferentes concentraciones de estos solventes (0.1 a 5 mM) así como a mezclas de los mismos (tolueno y acetona, tolueno y benceno). Los resultados no presentaron un incremento significativo en el número de micronúcleos de linfocitos binucleados después de 48 horas de tratamiento *in vitro*. La adición de un factor metabólico externo (10% de la mezcla S9 por 2 h) en cultivos de sangre tratada con solventes orgánicos o sus mezclas no indujo Mn's. Estos resultados indican la ausencia de actividad genotóxica del tolueno, benceno, y acetona a nivel *in vitro*.

Mediante un estudio experimental se evaluó la actividad genotóxica del estireno en leucocitos periféricos humanos procedentes de 30 donantes sanos, genotipados para los polimorfismos de EPHX1 (epóxido hidrolasa), GSTP1, M1 y T1 (glutathion), pues dichas enzimas están involucradas en la activación metabólica del estireno a estireno-7,8-óxido (SO). La evaluación de la genotoxicidad se realizó por medio de la prueba de micronúcleos (Mn) y el ensayo del Cometa. Los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia de Mn y el daño en el ADN inducidos por el SO se ven influenciados por la edad; sin embargo no se detectó influencia del consumo de cigarrillo, y resultó poco claro el efecto del género. Se observó un incremento

en la longitud de la cola del Cometa a medida que desciende la actividad epóxido hidrolasa en células expuestas a SO, y un incremento en la frecuencia de Mn en donantes de baja actividad. Estos resultados son consecuentes con la actividad detoxificadora de esta enzima. Además, se detectó incrementos en la frecuencia de Mn para los genotipos GSTP1 *A/*B y *A/*C con respecto a los homocigotos silvestres *A/*A. Esto puede deberse a una baja actividad detoxificadora como consecuencia de la afinidad alterada de la proteína variante por el SO. Para los genotipos GSTM1 y GSTT1 no se obtuvieron resultados claros, incluso tras agrupar a los individuos con la misma actividad epóxido hidrolasa esperada, probablemente debido a que la conjugación con glutathion juega un papel minoritario en el metabolismo del estireno [100].

En una reciente investigación se estudió el efecto inducido por el estireno (STY), el tolueno (TOL), la acetona (ACE), el xileno (XYL) y el percloroetileno (PER), sobre las células epiteliales a través de la medición de la viabilidad celular con MTT y del ensayo Cometa como biomarcador de estrés oxidativo. El resultado indicó que en 8 h de exposición, el efecto tóxico del STY y PER, se redujo significativamente siempre a bajas concentraciones (10^2 ppm), mientras que el TOL y XYL redujeron la viabilidad significativamente a partir de 10^4 ppm. Además, la ACE no redujo seriamente la actividad mitocondrial. El registro de los Cometas demostró un incremento en la fragmentación de ADN a medida que aumentaba la concentración del vapor de todos los solventes evaluados, pero fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) únicamente a concentraciones menores que 10^3 ppm. El daño al ADN consecuencia de la exposición al STY y al PER ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente a 10^5 y 10^6 ppm) fue más relevante comparado con otros solventes ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ a 10^5 y 10^6 ppm, respectivamente) [39].

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada hasta el momento, no es difícil asegurar que la información disponible acerca de la genotoxicidad inducida por el tiner, como mezcla compleja de solventes, es insuficiente. Por lo tanto, es conveniente desarrollar nuevos métodos de estudio que permitan la evaluación del verdadero efecto no solo de los compuestos simples, como se ha venido mencionando, si no también de mezclas complejas, las cuales son el verdadero escenario de exposición. Razón por la cual, este estudio brinda un importante aporte en el conocimiento científico sobre la toxicología de mezclas complejas; y en la identificación de los posibles agentes genotóxicos contenidos en el tiner, o de su potencial efecto inducido de manera conjunta, posiblemente por el efecto sinérgico, aditivo o potenciador de la mezcla resultante. Además, de contribuir en la evaluación del riesgo para la salud de sujetos expuestos a estas mezclas de solventes.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 SOLVENTES ORGÁNICOS

Los solventes orgánicos son un grupo de químicos que incluyen a un gran número de compuestos líquidos heterogéneos de volatilidad variable que forman una clase importante de contaminantes en el aire ambiental, y presentan una particular afinidad a moléculas lipofílicas [39]. Por sus propiedades fisicoquímicas son usados como adelgazantes o medios de solubilización de compuestos orgánicos, con el fin de potenciar o retardar los efectos de los compuestos sobre los que actúan; son ampliamente usados como constituyentes de pinturas, barnices, colorantes, tintes, pegamentos y aerosoles, para la extracción y síntesis de productos químicos e industriales. Además de ser comúnmente usados como aditivos de combustibles [181]. La prevalencia de los solventes orgánicos en la atmósfera significa que la exposición a solventes es generalmente inevitable, permitiendo que los humanos estén expuestos por tiempos prolongados y en combinación con otros compuestos [23, 179].

Todos los solventes están constituidos por compuestos químicos orgánicos o mezclas de los mismos, y se caracterizan por ser líquidos, de peso molecular ligero, volátiles, poco polares, combustibles e inflamables y en general, inducen efectos adversos a nivel respiratorio, cardíaco y renal, así como neurotoxicidad [97], hepatotoxicidad [20], y carcinogenicidad [106]. De lo anterior, el uso de solventes presenta a nivel humano un elevado riesgo para la salud, sobre todo en aquellas personas que diariamente se ven expuestas a razón de su trabajo, siendo la inhalación y/o la absorción vía dérmica las principales rutas de exposición. Aproximadamente, del 50 al 60% de la cantidad inhalada es absorbida por el organismo [146]. Una vez que penetran en el organismo los solventes se distribuyen por los tejidos y órganos internos donde son sujetos a biotransformación, principalmente en el hígado, con la participación de reacciones de oxidación y conjugación que inducen a una detoxificación y eliminación. Además, se acumulan en los tejidos con abundantes lípidos como el tejido nervioso.

Aunque la toxicidad por inhalación ha sido estudiada por décadas, el interés de los efectos por absorción cutánea de xenobióticos es más reciente; en la literatura se reportan pocos datos sobre los riesgos relacionados con esta ruta de penetración de compuestos volátiles; sin embargo se ha demostrado que el contacto directo o inmersión de las manos dentro de muchos solventes en estado líquido causa edema, dermatitis con resequedad, descamación y fisuración cutánea, denominados como efectos locales [36].

Actualmente, la principal fuente de exposición ocupacional a solventes orgánicos, es debida a la producción y el uso de pinturas y colorantes ya que cerca del 50% de los solventes sintetizados, son empleados para la producción de pinturas y adelgazantes “tíners”, donde el papel específico del solvente es evaporarse espontáneamente en el ambiente después de solubilizar y diluir las pinturas. El xileno, tolueno, estireno, percloroetileno, acetona, y metiletilcetona son algunos de los solventes que cuantitativamente representan la composición de pinturas, con cierta frecuencia [39]. Las propiedades de cada solvente, se relacionan con su estructura química, que determinan su aplicación, el grado de dispersión en el ambiente y el perfil toxicológico en sujetos expuestos [162].

6.2 EL “TÍNER”

Dentro del grupo de solventes de mayor uso domestico e industrial se encuentra el “tíner”, el cual es una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, cetonas y alcoholes, de color transparente y olor característico. En cuanto a su composición química, ésta es balanceada para no afectar el secado y brillo de las pinturas, y en cuanto a su utilidad, éste se considera como el más adecuado para lavar y desengrasar materiales. Es empleado en diferentes actividades económicas, pues efectivamente resulta ser muy útil en el buen desempeño de diferentes labores como la carpintería, zapatería, ebanistería, entre otros, pero el mayor uso que se le da en estos momentos al tíner, esta dirigido hacia el sector de pinturas. La inhalación de solventes como el tíner en cantidades que no causan perdida de conciencia resulta en euforia y relajación similar a la ingestión de alcohol. Por otro lado, la excesiva inhalación a dosis máximas puede causar depresión del sistema nervioso, inconciencia, paro respiratorio e incluso la muerte [26].

En la industria de pinturas, los solventes o mezclas complejas de disolventes activos, cosolventes y diluyentes, conforman lo que se denomina tíner o adelgazador. En términos generales los componentes básicos del tíner se pueden clasificar como:

Solventes activos o disolventes. Son aquellos líquidos volátiles altamente polares, capaces de disolver resinas sintéticas a cualquier concentración y que son difíciles de ser puestas en solución, es decir que el solvente activo es el que tendrá un efecto directo sobre lo que se está disolviendo. En este grupo se encuentran esterres, cetonas y éteres de glicol, los de uso más común son: acetato de etilo, acetato de amilo, acetato de propilo, acetona, metil etil cetona (MEK) y metil isobutil cetona (MIBK).

Cosolventes, no solventes o solventes latentes. Son líquidos orgánicos, que en combinación con un disolvente activo, ayudan a disolver resinas. En la fabricación de tñer, los cosolventes son de vital importancia pues estos potenciarán el efecto del solvente activo. Dentro de esta categoría se encuentran a los alcoholes; comúnmente los más utilizados son el isopropílico, el n-propílico, el isobutanol, el n-butanol, el metílico, el amílico y el etílico, en los términos tolerados.

Diluyentes, base o soporte. Son los hidrocarburos y parafinas que no tienen ningún poder disolvente sobre algunas resinas sintéticas pero en cambio disuelven las resinas naturales casi sin excepción. Como diluyentes son ampliadores de las mezclas de solventes verdaderos y cosolventes, dando ciertas características a las soluciones y principalmente reduciendo los costos en la fabricación del tñer al darle volumen al compuesto.

Estos hidrocarburos miden el poder disolvente y pueden controlar propiedades físicas como fluidez, peso específico y contenido de sólidos. Solo los diluyentes presentan valores de viscosidad mayores que los equivalentes a las soluciones en solventes activos únicamente. Los diluyentes utilizados en el tñer son el tolueno y xilenos, los cuales dan una buena relación de dilución de acuerdo al solvente activo que esté en uso. En la clasificación de estos hidrocarburos, teniendo en cuenta su poder disolvente, se clasifican como: hidrocarburos cíclicos no saturados (aromáticos de la serie del benceno: como tolueno, xilenos), hidrocarburos cíclicos saturados (naftenicos: como ciclohexano) e hidrocarburos saturados de cadena abierta (alifáticos: como hexano, pentano).

Retardadores. Estos constituyentes inciden directamente sobre la velocidad de evaporación, evitando problemas en la aplicación de pinturas. Contienen dos grupos activos dentro de la molécula (alcohol y éter), los cuales actúan como acopladores para compuestos semejantes [123].

En la formulación de pinturas, es corriente emplear mezclas de estas cuatro clases de líquidos, de manera que se logre un ajuste adecuado de acuerdo con la necesidad exigida. Los rangos de utilización de los componentes en la fabricación de tñer para la fabricación de pinturas basadas en nitrocelulosa, son los siguientes: disolvente activo, 16-22%; cosolvente, 12-16%; retardador 3 -9% y diluyente 55 -60% [123].

Análisis realizados por ECOPETROL, mediante cromatografía de gases, permitieron identificar los componentes de dos muestras de tñer, el tñer 0.14 y corriente; detectando una predominancia del tolueno y m-xileno, respectivamente [78].

Tabla 1. Componentes del tñner según ECOPETROL, analizados por cromatografía de gases mediante la prueba del PIANO

COMPONENTE	TÍNER 0.14	TÍNER CORRIENTE
Tolueno	23.68	1.31
m-Xileno	16.87	22.07
p-Xileno	6.89	9.20
o-Xileno	1.58	2.77
Hexano	12.55	-
2,3-Dimetilhexano	7.86	-
Noveno	9.68	-
Isobutano	23.55	-
Octano	4.65	-
Etil benceno	7.03	-
~ 50 compuestos más con una masa <1%		

Hoyos, 2003

6.2.1 Principales componentes del tñner

Tolueno. Principal componente de la mayoría de los tñners (entre el 60–70% del volumen total) [110]. El tolueno es principalmente metabolizado a ácido benzoico, sin embargo, un metabolito menor del tolueno (~1%) es el responsable de los efectos tóxicos del tñner. De hecho, una vía menor de metabolismo del tolueno forma el epóxido tolueno, el cual se reestructura al cresol; que a su vez, es hidroxilado para formar metilhidroquinona y metilbenzoquinona. Estas quinonas, durante los procesos redox generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar “estrés oxidativo” y daño oxidativo al ADN [120]. El metabolito menor del tolueno p-cresol, también puede inducir daño del ADN por alquilación directa. La oxidación enzimática del p-cresol resulta en la formación de metidol quinona que reacciona con el ADN. Los aductos de ADN resultantes se han propuesto como biomarcadores específicos para la exposición al tolueno en los humanos [63].

Xileno. Es un hidrocarburo aromático del cual existen tres formas isoméricas: orto, meta y para. El xileno grado técnico también contiene etilbenceno. El 95% del xileno absorbido es eficientemente metabolizado. Un 3-6% es exhalado sin transformación. La principal vía metabólica de los xilenos (o, m, p) es la del metabolismo a ácido metilbenzoico por oxidación de uno de los grupos metilo, este ácido al combinarse con la glicina se biotransformado a ácido metilhipurico, el cual es excretado en la orina. Este solvente no se acumula significativamente en el cuerpo humano [87].

Etilbenceno. Es un hidrocarburo aromático obtenido por a alquilación de benceno y etileno. Es usado principalmente en la producción de estireno. La volatilización a

la atmósfera es rápida. El etilbenceno es altamente metabolizado a ácido mandélico y ácido flenilglioxílico [88].

6.3 ENSAYO COMETA

En las dos últimas décadas se han desarrollado investigaciones para implementar nuevas metodologías, que permitan evaluar el daño citogenético. Una de ellas es la prueba de electroforesis alcalina de células individuales (SCG), también conocida como ensayo Cometa, la cual es una técnica relativamente simple, rápida y flexible, para medir cualitativa y cuantitativamente el daño del ADN de células individuales vegetales o animales, y de pequeñas muestras de tejidos expuestos a agentes físicos o químicos [34, 57, 94, 116, 149, 158, 171]. Además su alta sensibilidad y especificidad la hace ventajosa frente a otras técnicas de detección de daño en el ADN ya establecidas, como lo son, las alteraciones cromosómicas estructurales, micronúcleos, niveles de aductos en el ADN, mutaciones e intercambio de cromátidas hermanas [102]. Sin embargo, ciertos estudios reflejan una estrecha concordancia entre los resultados obtenidos con el ensayo Cometa y con la prueba de alteraciones cromosómicas dentro de una misma línea celular u organismo [3, 107, 117, 161]. Muchos compuestos han sido investigados y evaluados por el ensayo Cometa, entre estos se encuentran los químicos industriales, agroquímicos, aditivos de comida, nitrosaminas, metales, pesticidas y drogas anticáncer [21, 149].

Rydberg y Johanson en 1978 [151] fueron los primeros en cuantificar directamente el daño del ADN en células individuales, lisándolas y embebiéndolas en agarosa sobre condiciones alcalinas para permitir el desenrollamiento parcial del ADN. Después de la neutralización las células se tiñeron con naranja de acridina y el daño del ADN se cuantificó a partir de la tasa de fluorescencia de roja (quebres de cadena simple) a verde (quebres de cadena doble) en las células [157].

Para certificar la sensibilidad de detección de daño en el ADN, Ostling y Johanson en 1984 [131], expusieron células individuales a rayos gamma, y mostraron que las células lisadas con detergentes y sales concentradas, cuando son electroforizadas en agarosa sobre placas de microscopio bajo condiciones neutras (pH 7-8) permiten evaluar dicho daño. De hecho, la tinción fluorescente con naranja de acridina, permitió observar una imagen con la apariencia de un "Cometa", identificando una cabeza intensamente brillante, y una prolongación equivalente a una cola, cuya longitud e intensidad estarán relacionadas con la cantidad de rupturas de cadena de ADN, dependientes a la dosis de radiación. Sin embargo esta versión de la técnica únicamente permite la detección de quebres de cadena doble, limitando su utilidad para solo estudios que involucren radiación o exposición a químicos radiomiméticos [173]. El acercamiento de Ostling y Johanson estaba basado en un trabajo anteriormente publicado en 1975 por Cook

et al. [37], quién desarrolló un método para investigar la estructura nuclear basada en la lisis altamente salina de células con detergentes no-iónicos.

Posteriormente, en 1988 Singh *et al.* [159], utilizó la misma técnica pero bajo condiciones alcalinas (pH>13), capaz de detectar quiebres de cadena simple asociados con sitios de reparación por escisión incompleta y sitios lábiles al álcali, porque la mayoría de los agentes genotóxicos inducen en orden de magnitud más quiebres de cadena simple y/o sitios lábiles al álcali, que sitios de cadena doble. Esta versión del ensayo es más versátil y ofrece un incremento en la sensibilidad para identificar agentes genotóxicos. Dos años después, Olive *et al.* [127], introdujo otra versión alcalina de este ensayo, en el cual el ADN es electroforizado a pH 12.3, permitiendo solamente detectar quiebres de cadena simple y sitios de reparación incompleta. Recientemente el ensayo fue modificado para permitir la detección de tipos específicos de daño al ADN como el uso de endonucleasas y formamidopirimidina glicosilasa para identificar pirimidinas oxidadas y lesiones en 8-hidroxiguanina, respectivamente [8, 35, 50, 110].

En síntesis, la versión alcalina del ensayo Cometa permite detectar a partir de un incremento en la migración del ADN, quiebres de cadena doble, quiebres de cadena simple, sitios de reparación por escisión incompleta y ciertas lesiones que se pueden transformar en quiebres de cadena simple usando un pH alcalino (sitios lábiles álcali). Por otro lado una disminución en la migración del ADN permite detectar *crosslinks* ADN-ADN / ADN-proteína [165].

Cuadro 1. Tipo de daño expresado como quiebre de cadena en el ADN, de acuerdo a las condiciones de pH, durante el desenrollamiento y la electroforesis

pH	TIPO DE DAÑO
Neutro (pH 7-8, algunos pH 10)	Quiebres de cadena doble
Alcalino entre 12.1 y 12.5	Quiebres de cadena doble, quiebres de cadena simple, "crosslinks", y quiebres de cadena simple asociados con sitios de reparación por escisión incompleta
Alcalino mayor de 13	Quiebres de cadena doble, máxima expresión de quiebres de cadena simple, "crosslinks" ADN-ADN /ADN-Proteína, quiebres de cadena simple asociados con sitios de reparación por escisión incompleta (ej. Sitios apurínicos), y sitios lábiles al álcali

Tice *et al.*, 2000

pdfMachine

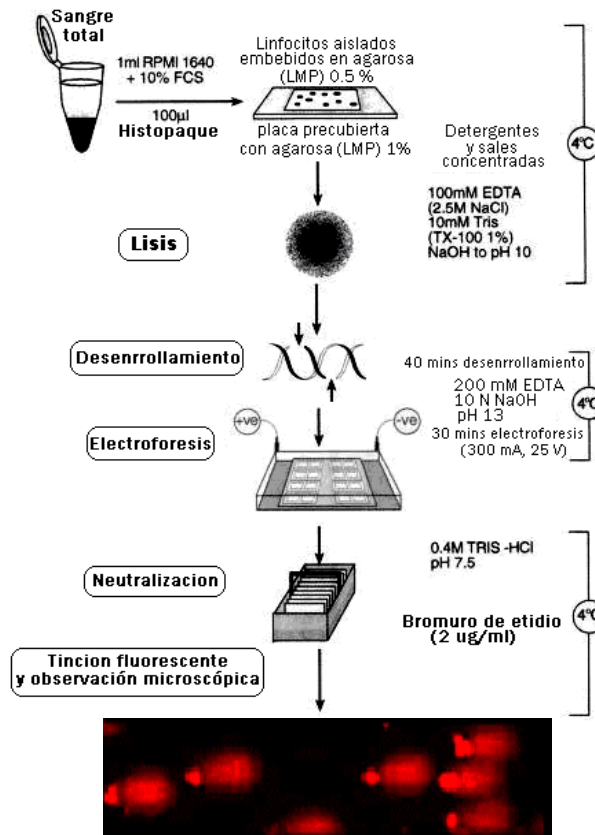
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

6.3.1 Principio del ensayo Cometa alcalino. En general, el ensayo Cometa alcalino consiste en varias etapas, empezando con el aislamiento de células, la mezcla de células y geles de agarosa, lisis, desenrollamiento alcalino, electroforesis, neutralización, coloración y análisis [42] (Fig. 1).

Figura 1. Protocolo esquemático del ensayo Cometa



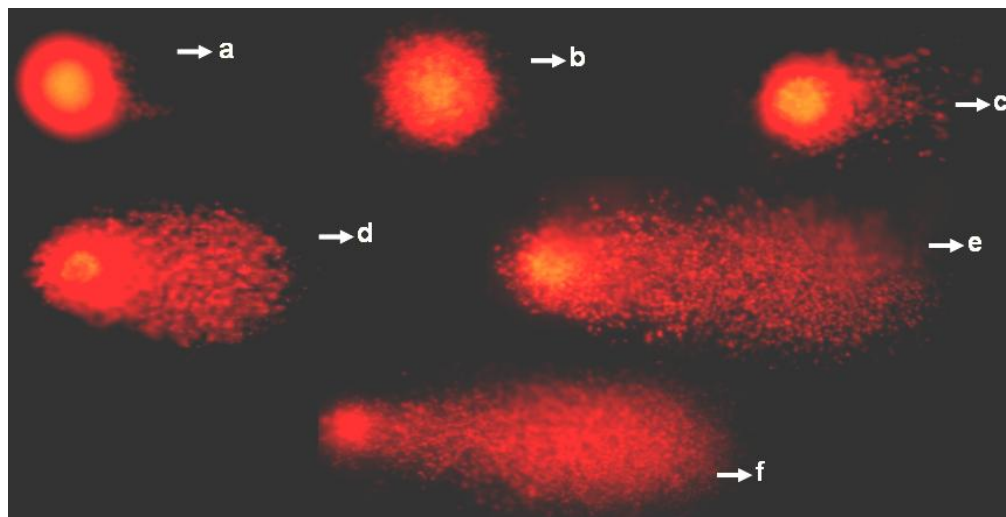
Adaptado de Cutler and Rodríguez, 2003

Cuando la suspensión celular es embebida en agarosa de bajo punto de fusión, esta es distribuida sobre una placa de microscopio precubierta con agarosa de punto de fusión normal, formando un “sandwich” de geles. Posteriormente las células son lisadas en un buffer (Triton X100 1 % / NaCl 2.5 M, pH 10) para remover el contenido celular, excepto el material nuclear, (aquí el ADN se mantiene superenrollado en presencia de pequeñas cantidades de proteínas no histónicas). Seguido de ello las placas son ubicadas en el álcali (NaOH 10N / EDTA 200mM, pH \geq 13), para que comience el desenrollamiento de la doble hélice, y luego son sometidas a electroforesis ($0.8 -1.5 \text{ V cm}^{-1}$) bajo esas mismas condiciones de alcalinidad. Después del proceso electroforético, las células con

mayor daño genético, despliegan un incremento en la migración de los fragmentos de ADN dañado, desde el núcleo hacia el ánodo, bajo una corriente eléctrica, dando una apariencia de un Cometa estelar; en contraste, las células no dañadas presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola, de ahí que el ADN solo se moverá hacia el ánodo, si existen quiebres en la cadena. Esto solo logrará visualizarse con la tinción apropiada, como el bromuro de etídio, tinción de plata o colorantes fluorescentes.

6.3.2 Parámetros de medición de los Cometas. Para medir quiebres del ADN por el ensayo Cometa se usa el análisis visual y/o el análisis de imagen computarizado. En el proceso de análisis visual, los Cometas son clasificados en base a su morfología a partir de 5 categorías de clasificación así: A) no daño en el ADN, B) daño bajo, C) daño medio, D) daño alto y E) daño total (Fig. 2) [6], y el daño en el ADN se evalúa como un incremento en el porcentaje de células con Cometa. Los Cometas son categorizados sobre una escala según su tamaño o midiendo la longitud de la cola en micrómetros.

Figura 2. Microfotografía de linfocitos tratados con tiner a 400x, muestra la clasificación visual de la morfología de los núcleos: a) sin daño en el ADN, b) daño bajo, c) daño medio, d) daño alto, e) daño total y f) daño apoptótico



El análisis de imagen computarizado se realiza usando paquetes comerciales de programas, tales como el Komet (Kinetic Imagin, UK); Viscomet (Impluls, Germany), Ensayo Cometa π (Perceptive Instruments, UK) y CASP (Comet Assay Software Project; University of Wroclaw) [98], los cuales proveen criterios de medición adicionales, comparado con el análisis visual, que favorecen la evaluación de pequeñas cantidades de ADN migrado. Entre los muchos

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

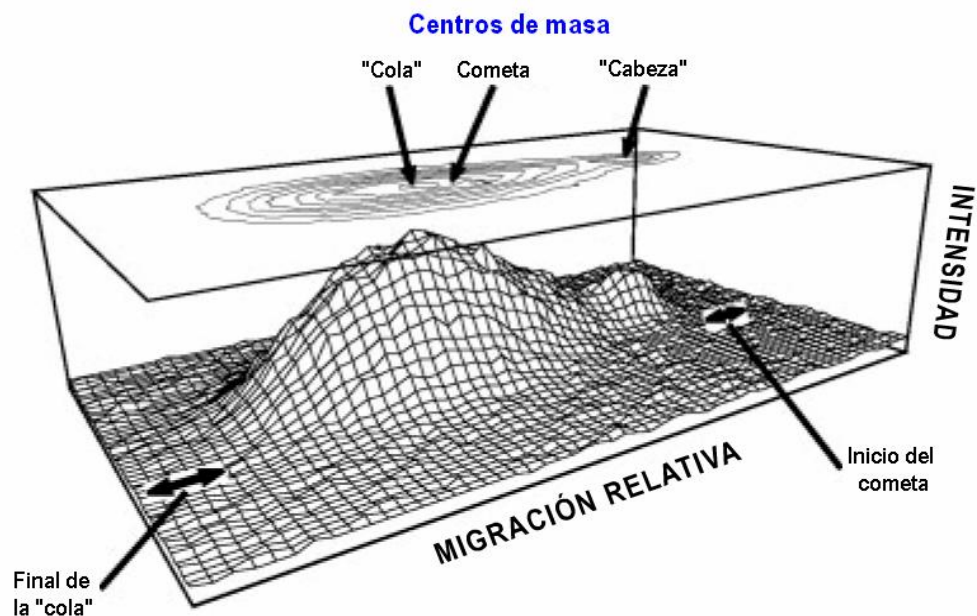
Get yours now!

parámetros empleados para caracterizar Cometas, los más frecuentemente usados son, longitud de la imagen total, longitud de cola, fluorescencia relativa de la cola (o porcentaje de ADN en la cola) y momento de cola, que se refiere a longitud de migración del ADN vs. porcentaje de ADN en la cola [9].

El concepto de longitud del Cometa o longitud de la cola como migraciones del ADN fueron desarrollados por Singh *et al.* [159]. El momento de cola y porcentaje de ADN en la cola fueron introducidas por Olive *et al.* [127] y Muller *et al.* [119], siendo estos los parámetros más utilizados, por los investigadores para la evaluación del daño en el ADN [33, 38, 48, 101, 110]. Este tipo de análisis computarizado, requiere de una cámara CCD de alta resolución para capturar la imagen, asegurando una máxima sensibilidad.

La figura 3 muestra la imagen digitalizada de un Cometa en 3D, la cual ilustra muchos de los aspectos relevantes para tener en cuenta cuando se cuantifica el daño en el ADN mediante el ensayo Cometa, como lo son la cabeza y la cola del Cometa, aspectos que logran ser valorados de acuerdo a la intensidad y migración capturados en la imagen del "Cometa" [128].

Figura 3. Imagen digitalizada de un Cometa



Adaptado de Olive and Durand, 2005

6.3.3 Ventajas y aplicaciones del ensayo. Desde la introducción del ensayo Cometa alcalino en la toxicología genética, se ha incrementado el número de

investigadores que aplican esta técnica. Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, las ventajas de la técnica incluyen: a) una demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño en el ADN. b) requiere de un pequeño número de células por muestra. c) posee flexibilidad. d) bajos costos. e) rápida y fácil aplicación. f) la habilidad de conducir estudios usando cantidades relativamente pequeñas de una sustancia a evaluar y de reactivos. g) el relativamente corto período de tiempo (pocos días) necesarios para completar un experimento. h) ajustable a cualquier célula eucariota [171].

Este ensayo ha sido una herramienta básica para los investigadores interesados en las áreas de: biomonitoreo ambiental, el cual se puede analizar usando especies animales endémicas como organismos centinelas o biomarcadores de exposición (ecotoxicología) [14, 40, 132]; en biomonitoreo humano, como una herramienta sensible y valiosa para medir daño de ADN después de la exposición ocupacional a químicos tales como pesticidas, benzo-a-pireno, estireno, naftaleno, 1,3-butadieno, solventes orgánicos, radiación ionizante, gases tales como radón, humo de tabaco, y metales tóxicos [51, 58, 59, 92]; en investigaciones sobre mecanismos de reparación del ADN [57, 164]; en detección de apoptosis y/o necrosis [61, 96, 158] e importantes aplicaciones a nivel clínico, desde su introducción como una herramienta para la medición de genotoxicidad inducida por quimioterapia en células tumorales para permitir establecer asociaciones entre pacientes con cáncer y el incremento del daño en el ADN, así como definir si esos pacientes son más susceptibles genéticamente que las personas saludables [149].

A nivel de toxicología genética se incluyen: a) estudios para distinguir entre genotoxicidad y citotoxicidad inducida por daño cromosómico. b) en estudios *in vitro* y/o *in vivo* de la genotoxicidad de diversos químicos. c) y potencialmente como una parte de los ensayos *in vitro* y/o *in vivo* para complementar la información [171].

6.4 APOPTÓISIS VS. ENSAYO COMETA

La apoptosis se define como un proceso biológicamente organizado, que permite mantener la homeostasis y el adecuado funcionamiento de tejidos por la eliminación de células dañadas o alteradas. La apoptosis involucra una serie de complejos interactivos que son regulados y que permiten la muerte celular. La iniciación de la apoptosis puede involucrar mecanismos vía receptores o señales inducidas por el daño al ADN [186]. La vía de señalamiento apoptótico consiste de factores mitocondriales derivados (citocromo c y la familia de proteínas bcl-2), receptores (factor de tumor necrosis, FADD) y/o mecanismos transcripcionales (p53 y c-myc) que interactúan en el proceso apoptótico liberando proteasas, como caspasas y ADN endonucleasas. La activación de las caspasas inicia una cascada proteolítica letal. Los sustratos de las proteasas incluyen proteínas citoplásmicas y

nucleares involucradas en reparación y replicación del ADN, “splicing” de ADN, estructura citoesquelética y división celular. Una vez las caspasas son activadas, surgen los rasgos morfológicos característicos de la apoptosis y el proceso letal no se puede detener [77]. Estas características morfológicas de una célula apoptótica incluyen la formación de protuberancias membranales, reducción del tamaño celular, alteración del citoesqueleto, condensación de la cromatina, desintegración nucleolar, fragmentación nuclear, pérdida del contacto célula-célula y externalización de la fosfatidilserina. El estado final de la apoptosis es la absorción fagocítica y la degradación de los cuerpos apoptóticos, que se reconocen por cambios en las proteínas de superficie celular y lípidos.

Por otro lado, el ensayo Cometa se basa en la asunción de que la migración de ADN de los núcleos, después de la electroforesis, es el resultado de daño genotóxico, equivalente a daños o lesiones de cadena simple/doble del ADN. Una crítica a esta prueba, se basa en el hecho de que algunas o todas las imágenes pueden ser resultado de estadíos tempranos de apoptosis, provocando de esta manera falsos positivos [30], y generando un gran interrogante sobre la utilidad y validez del ensayo como prueba de genotoxicidad.

De hecho, la presencia de niveles extremadamente altos de migración de ADN en el ensayo Cometa puede asociarse con citotoxicidad en forma de necrosis o apoptosis [76, 142], relacionándose cualitativamente de acuerdo a la morfología exhibida en la imagen del Cometa; sugiriendo que la fragmentación nuclear apoptótica, produce Cometas de cabeza pequeña con cola larga y globular, también conocidas como imágenes “hedgehog”, mientras que las células necróticas exhiben Cometas de cabezas largas con colas largas y delgadas, las cuales son indistinguibles de Cometas formados por daño al ADN inducido por una genotóxina [171].

Sin embargo, cierto estudio realizado por Rundell *et al.* [150] permitió medir y diferenciar cuantitativamente las células apoptóticas de las células con daño en el ADN mediante el ensayo Cometa, y en base a la habilidad de reparar su ADN genómico, pues una vez comienza la fragmentación del ADN en la apoptosis, su reparación no puede ocurrir, y el núcleo no se reensamblará bajo ninguna condición. Para ello, se aplicó la metodología, basada en el sometimiento de las células a un período de recuperación “Liquid Holding”, en el cual las lesiones del ADN son reparadas, mientras que las células con fragmentación nuclear apoptótica no podrán reparar el daño, y por consiguiente no habrá diferencia entre las células sometidas al tiempo de recuperación líquida vs. aquellas que no fueron sometidas al tiempo de recuperación. Lo cual permite valorar y evidenciar la efectividad del ensayo Cometa, como prueba de genotoxicidad.

7. METODOLOGÍA

7.1 QUÍMICOS Y SOLVENTES

La sustancia evaluada en este estudio fue el tíner 0.14 comercial con las características previamente descritas, el cual después de ser esterilizado por filtración (Membrana de Nylon con porosidad $0,22\mu$ y diámetro de 25 mm), se almacenó en un recipiente hermético de vidrio para evitar su volatilización a temperatura ambiente. Dada la naturaleza fisicoquímica del tíner y su consecuente baja solubilidad en medio acuoso, se empleó como disolvente para la preparación de las soluciones y como control negativo, el dimetilsulfóxido, DMSO (D-8779 Sigma).

Para el aislamiento celular y el establecimiento de los cultivos celulares se empleó, Histopaque, (1077-1 Sigma); medio RPMI 1640 pH 7.2 ± 0.2 (R-8758 Sigma), L-glutamina (G-3126 Sigma); penicilina-streptomina (A-5955 Sigma), suero bovino fetal, SBF (16000-044 Invitrogen) y fitohemaglutinina, PHA (L-8754 Sigma).

Los químicos usados para el ensayo Cometa fueron: buffer fosfato salino, PBS (P-3813-10 Sigma) a pH:7.4; azul de tripano (T-6146 Sigma); peróxido de hidrogeno, H_2O_2 30% (H-1009 Sigma); agarosa de punto fusión normal, NMA al 1% (E.E.O 0.13-0.19 porosidad) (A-6877 Sigma); agarosa de bajo punto fusión, LMA al 0.5% (E.E.O ≤ 0.15 porosidad) (A-9414 Sigma); cloruro de sodio, NaCl (S-9625 Sigma); ácido etilenediaminetetraacético, EDTA (E-5134 Sigma); tris, trizma base (T-3253 Sigma); hidróxido de sodio, NaOH (S-8045 Sigma.); N- lauryl sarcosinato de sodio al 1% (L-5125 Sigma); TRITÓN X-100 (K-0320 Sigma); y bromuro de etidio, (E-7637 Sigma). Las soluciones acuosas, diluciones y lavados se prepararon con agua 18 M Ω (Milli-Q plus PF unit Millipore, Bedford, MA).

7.2 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo experimental, de carácter comparativo (Relación causa – efecto); y se dividió en dos grandes pruebas *in vitro*, una prueba de citotoxicidad aguda y una prueba para evaluar el daño genético y la reparación del ADN, aplicando el ensayo Cometa alcalino.

7.3 GRUPOS DE ESTUDIO

7.3.1 Grupo control negativo. Se empleó como control negativo el DMSO (No. CAS: 67-68-5), compuesto vehículo en todas las diluciones realizadas con la sustancia evaluada (tíner). La evaluación *in vitro* del DMSO mediante el ensayo Cometa, reporta que este no incrementa el daño en el ADN a concentraciones por debajo del 2%, pero si expresa un efecto genotóxico dosis dependiente a concentraciones mayores o iguales al 4% (posiblemente por presentarse una alta citotoxicidad) [71]. Por esta razón la concentración final del DMSO en el medio de cultivo no excedió el 1% (v/v) del volumen total [62, 95, 174, 177].

7.3.2 Grupo experimental. Este grupo correspondió a las diferentes concentraciones de tíner evaluadas, diluidas en DMSO, que se aplicaron como tratamiento tanto para la prueba de citotoxicidad aguda, como para la prueba de genotoxicidad, evaluada en el ensayo Cometa. La dosis más alta, fue aquella que no presentó efectos determinantes sobre el crecimiento celular. Las soluciones stock de cada concentración experimental, fueron preparadas justo antes de aplicar el tratamiento (frescas). Las soluciones preparadas fueron adicionadas al medio de cultivo para obtener una concentración final de 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,4; 0,600; 0,800; 1,000 y 1,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la prueba de citotoxicidad, y de 0,050; 0,100 y 0,200 para la prueba de genotoxicidad.

7.3.3 Grupo control positivo. El químico que frecuentemente se usa como control positivo en el ensayo Cometa, es el peróxido de hidrogeno, H_2O_2 (No. CAS: 7722-84-1), agente genotóxico que no requiere de activación metabólica [62]. El peroxido fue diluido en PBS estéril, y llevado a una concentración de $40\mu\text{M}$, dosis que se conoce por literatura [6], y por calibración realizada en el laboratorio de toxicología genética y citogenética de la Universidad del Cauca, presenta un incremento significativo en la migración del ADN, sin inducir muerte celular. Además, este químico causa quiebres de cadena en el ADN por estrés oxidativo [25, 66], al igual que los solventes orgánicos [39, 110]. De igual manera permitió comprobar que las condiciones de la prueba fueron las óptimas, al permitir la observación de colas o Cometas.

Cuadro 2. Descripción de cada una de las variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	NIVEL VARIABLE	DATO	MEDIDA DE RESUMEN	DEFINICIÓN OPERATIVA
CITOTOXICIDAD AGUDA							
Concentración de tiner	Independiente	Cuantitativa	Razón	DMSO	μL / mL	Frecuencia	1
				0,025			2
				0,050			3
				0,100			4
				0,200			5
				0,400			6
				0,600			7
				0,800			8
				1,000			9
				1,200			10
				H ₂ O ₂ = 40			μM
Viabilidad celular	Dependiente	Cuantitativa	Razón	NA*	% de células vivas por cultivo	Promedio del porcentaje de viabilidad por concentración evaluada	
ENSAYO COMETA							
Concentración de tiner	Independiente	Cuantitativo	Razón	DMSO	μL / mL	Frecuencia	1
				Dosis Alta 0,200			2
				Dosis Media 0,100			3
				Dosis Baja 0,050			4
				H ₂ O ₂ = 40			μM
Período de recuperación	Independiente	Cuantitativo	Razón	Con recuperación	Horas	Frecuencia	1
				Sin recuperación			2
Momento de cola (MC)	Dependiente	Cuantitativo	Razón	NA*	μm	Mediana del MC / cultivo. Promedio (±EE) por dosis	
Porcentaje de ADN en la cola	Dependiente	Cuantitativo	Razón	NA*	%	Mediana del %ADN cola / cultivo. Promedio (±EE) / dosis	

*No Aplica

7.4 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LINFOCITOS

Para cada experimento, ensayo Cometa y prueba de citotoxicidad, se obtuvieron respectivamente, de 10 a 25 mL de sangre periférica total heparinizada, colectada por venepuntura de un donador masculino sano, de 22 años, sin exposición excesiva y habitual a agentes tóxicos como cigarrillo, alcohol, drogas psicoactivas ni sustancias químicas específicas o a radiación, durante los cuatro meses previos

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

a la toma de muestras. Posteriormente se aislaron los linfocitos (células mononucleares) por medio del gradiente de densidad empleando Ficoll-Hipaque (histopaque); centrifugando a 2600 r.p.m por 30 min, y se realizaron 2 lavados con PBS estéril libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} centrifugando nuevamente a 1200 r.p.m por 15 min [79]. El aislamiento de linfocitos para el ensayo Cometa, se realizó aplicando una ligera modificación del procedimiento anteriormente descrito, pues la sangre total antes de ser aislada, primero se diluyó en proporción 1:1 en buffer fosfato salino pH 7.4 [100]. El Pellet celular se resuspendió en 6 mL de PBS, y 1 ml de esta suspensión se usó para el ensayo Cometa o para incubación *in vitro*.

Para ambos experimentos, aproximadamente 3×10^5 linfocitos se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina al 1%; penicilina-streptomina al 1 %, SBF al 5 %, y PHA al 2% que se agregó a cada tubo (medio completo); e incubados por 24 h a 37°C en atmósfera húmeda, antes del tratamiento. Pasado este período de incubación, las células se lavarón con PBS y se trataron con una concentración de tiner; este tratamiento se realizó en ausencia de SBF porque el suero ha mostrado disminuir los efectos en el ensayo Cometa [5]. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad, usando guantes, tapabocas y recipientes estériles o nuevos.

7.5 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD AGUDA

7.5.1 Selección de las dosis experimentales/ensayos preliminares. Para determinar el rango de exposición (concentraciones) de tiner a utilizar, se llevaron a cabo ensayos preliminares, en el que se sometieron cultivos de sangre total y linfocitos aislados a diferentes concentraciones de tiner para aplicar la prueba de citotoxicidad a partir del registro del índice mitótico y viabilidad celular con azul de tripano respectivamente.

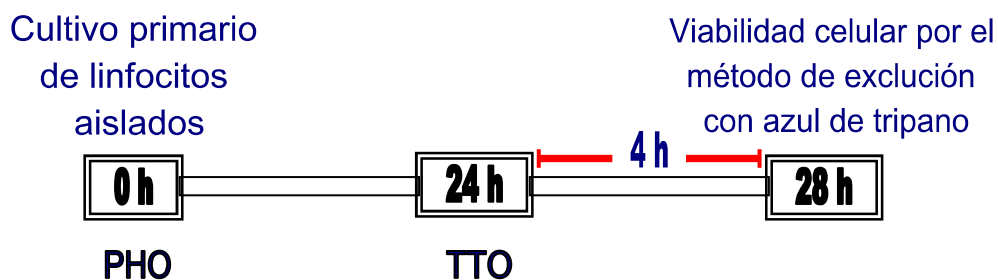
7.5.2 Citotoxicidad aguda. Para la prueba de citotoxicidad aguda, mediante un diseño completamente aleatorio, se aplicaron once tratamientos a muestras independientes, considerando a cada cultivo celular como la unidad experimental y de muestreo. Se asignaron nueve tratamientos con tiner a diferentes concentraciones y dos controles (positivo y negativo). Cada tratamiento se aplicó por duplicado (dos cultivos) en cada experimento y se realizaron cinco réplicas del experimento. El registro de variables fue posterior al tratamiento.

Para ello, se aplicó una modificación del método en microplacas establecido por otros autores [95, 139, 140] para evaluar agentes químicos. En este caso, los linfocitos se cultivaron en tubos eppendorf de tapa rosca (2 mL) y se incubaron por 24 h a 37°C, se lavaron con PBS estéril, y posteriormente se trataron de la siguiente manera: 108 a 118 μl de medio, 80 a 90 μl de suspensión celular (3×10^5

células/ml) más 2 µl de tratamiento en concentraciones crecientes de tiner, para un volumen final de 200 µl. Luego se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda durante un período de cuatro horas [140, 150]. Después del tratamiento las células se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 200 µL de PBS fresco para retirar el tratamiento.

La citotoxicidad se determinó tomando de cada tubo eppendorf pequeñas alícuotas de suspensión celular tratada (40 µL) y mezclando con 20 µL de azul de tripano al 0.4%, para estimar el porcentaje de viabilidad, contando el número de células viables en un hemocitómetro a una magnificación de 400x usando un microscopio óptico (Nikon). Este método permitió establecer una relación dosis-efecto (curva de citotoxicidad) (Fig. 4). El análisis estadístico se basó en la respuesta de cada uno de los cultivos.

Figura 4. Programa de tratamiento para la prueba de citotoxicidad aguda: Fase S



7.6 ENSAYO COMETA

7.6.1 Condiciones del ensayo. Para evaluar el daño genético y la reparación del ADN, mediante un diseño pareado se asignaron a cinco cultivos celulares (unidad experimental y de muestreo) tres tratamientos con tiner (dosis alta, media y baja, seleccionadas en la prueba de citotoxicidad) y dos controles (positivo y negativo). Cada tratamiento se efectuó por duplicado (dos cultivos) en cada experimento y se realizaron tres réplicas del experimento [104, 140, 171]. Para ello, los linfocitos se trataron durante una hora con la sustancia a evaluar; además de ser sometidos a un período de recuperación líquida de cuatro horas a 37°C, en atmósfera húmeda.

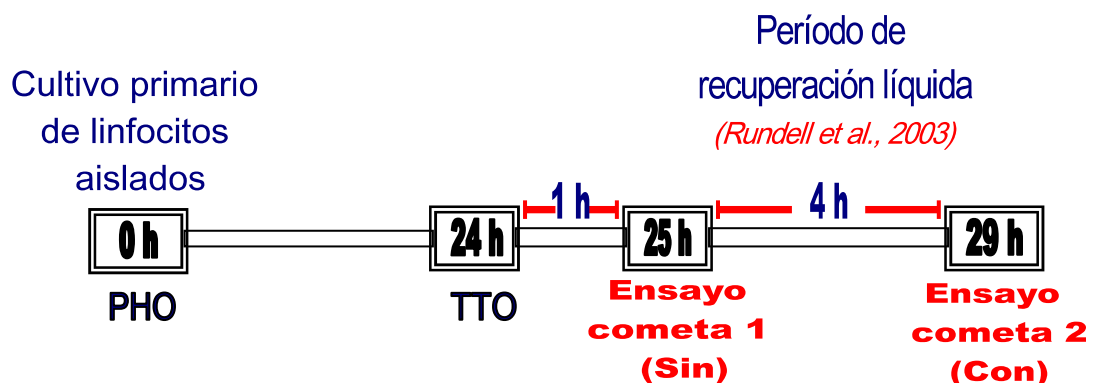
Una alícuota de 2 µL de cada concentración experimental (alta, media y baja), se usó para tratar de 80-90 µL de células suspendidas en medio completo. El volumen final del cultivo fue de 200 µL. La concentración máxima de la sustancia a evaluar mediante el ensayo Cometa se determinó como la concentración en la

cual la viabilidad celular fue >85 %, y así evitar falsos positivos debido a la citotoxicidad [7, 76].

Después de una hora de tratamiento con las diferentes concentraciones de tíner, H₂O₂ (40 µM) y DMSO (1% v/v) como controles, se realizaron lavados con 200 µL de PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (2 veces) para retirar el tratamiento, y se llevaron a centrifugación a 1500 rpm por 5 min y 5000 rpm por 2 min, respectivamente.

De los cultivos tratados se extrajo una pequeña muestra, que se llevó inmediatamente a procesamiento de placas para el ensayo Cometa, mientras que el remanente celular, se incubó por cuatro horas en medio fresco sin SBF, lo que permitió evaluar el daño genético de células tratadas sin período de recuperación vs las células tratadas con período de recuperación [150] (Fig. 5). Este método permite diferenciar las células apoptóticas, de aquellas células con la capacidad de reparar el daño en su ADN, ya que una característica de la apoptosis es la fragmentación nuclear, y bajo estas condiciones las células no pueden reparar el daño en el ADN [188].

Figura 5. Programa de tratamiento para evaluar el daño genético mediante el ensayo Cometa sin y con período de recuperación: Fase S



Antes e inmediatamente después del tratamiento, se realizó el conteo celular y se determinó el porcentaje de viabilidad por el método de exclusión con azul de tripano al 0.4%, respectivamente.

El método para la preparación y electroforesis de las placas de Cometa fue el usado por Singh *et al.*, [159] con la técnica alcalina, pero básicamente se realizó de acuerdo al protocolo de Tice y Andrews, [172], Anderson *et al.* [6], Hartmann *et al.* [73], y Rundell *et al.* [150].

7.6.2 Preparación de las placas. Se usarón placas esmeriladas (portaobjetos de 60 x 24 mm) [160] para permitir la adhesión de las capas de geles de agarosa. Cada una de las placas estaban precubiertas con una capa base de agarosa de punto de fusión normal (NMP). Para ello se adicionó sobre cada placa 90 μL de agarosa NMP al 1% (p/v) a una temperatura de 60°C; estas se cubrierón inmediatamente con un primer cubreobjetos de 22 x 22 mm y se dejaron a temperatura ambiente por 5 min para que la agarosa solidifique. Esta capa se usó para promover la unión firme de la segunda capa que se adicionará después [149].

Se tomarón aproximadamente 10000 células tratadas y control, en un volumen aproximado de 10 μL y se mezclaron en un eppendorf con 75 μL de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0,5% (p/v) a 37°C para formar una suspensión celular.

Después de remover el cubreobjetos, 85 μL de la suspensión celular se pipeteó sobre la capa base de agarosa NMP (1%), se cubrió inmediatamente usando otro cubreobjetos, y se mantuvo a 4°C durante 5 minutos para que solidifique. Luego se retiró el cubreobjetos. Se procesarón dos placas por cultivo (cuatro placas por tratamiento).

Nota: Las soluciones de agarosa (LMP y NMP) se prepararon en PBS fresco y libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

7.6.3 Lisis. Posteriormente, se removió el cubreobjetos y las placas se sumergieron en un recipiente horizontal con 50 mL de buffer de lisis frío y fresco (NaCl 2.5 M, N-laurilsarcosinato de sodio al 1% (p/v), EDTA 100 mM, Tris 10 mM, tritón X-100 al 1% (v/v), DMSO al 10% (v/v) y pH 10) mantenidas en oscuridad a 4°C durante 12 horas, para remover citoplasma y proteínas nucleares, permaneciendo el ADN como nucleóide [8]. Pasado este tiempo de exposición se lavarón con PBS libre Ca^{2+} y Mg^{2+} durante 5 minutos evitando el desprendimiento del gel.

7.6.4 Desenrollamiento del ADN y Electroforesis. Antes de la electroforesis alcalina, las placas se ubicaron en la cámara de electroforesis horizontal (Fisher Scientific) registrando la posición de cada una de ellas, evitando espacios y con el terminal de la agarosa cercano al ánodo. Se acomodaron 10 placas en la cámara.

Se adicionó buffer de electroforesis fresco (NaOH 10 N y EDTA 200mM a $\text{pH} \geq 13$) hasta cubrir las placas por completo (aprox. 0.5cm por encima de su superficie). Las placas se dejaron en reposo alcalino a 4°C por 40 minutos. Este paso es crítico, pues permite el desenrollamiento del ADN y la expresión de los sitios lábiles al álcali en ruptura de cadena simple, antes de la electroforesis [171]. En la misma corrida se colocarón placas control positivo y control negativo.

La electroforesis se corrió a 25 V y ajustando la corriente a 300 mA (0.74 V/cm) usando una fuente de poder (Electrophoresis Power Suplí-EPs 301; Amersharr Pharmacia Biotech) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Seguido de la electroforesis las placas se ubicaron horizontalmente y los microgeles se neutralizaron con buffer Tris (Tris HCl 0.4 M a pH 7,5) agregando gotas por 15 minutos (tres lavados por 5 min cada uno). Esto con el fin de neutralizar el exceso de álcali. Las placas se lavaron con PBS, se deshidrataron con metanol absoluto por 2 minutos, se dejaron secar a temperatura ambiente (evitando el polvo y otras partículas) y se guardaron en un soporte sellado hasta el día del análisis de imagen.

7.6.5 Coloración. Para la coloración de ADN, las placas se rehidrataron con agua destilada fría. Posteriormente se adicionarán a cada placa 45 µL de bromuro de etidio (2 µg/mL) y se cubrierón con un cubreobjetos. Las placas teñidas se dejaron como máximo hasta 24 horas en oscuridad, debido a que el bromuro de etidio se degrada.

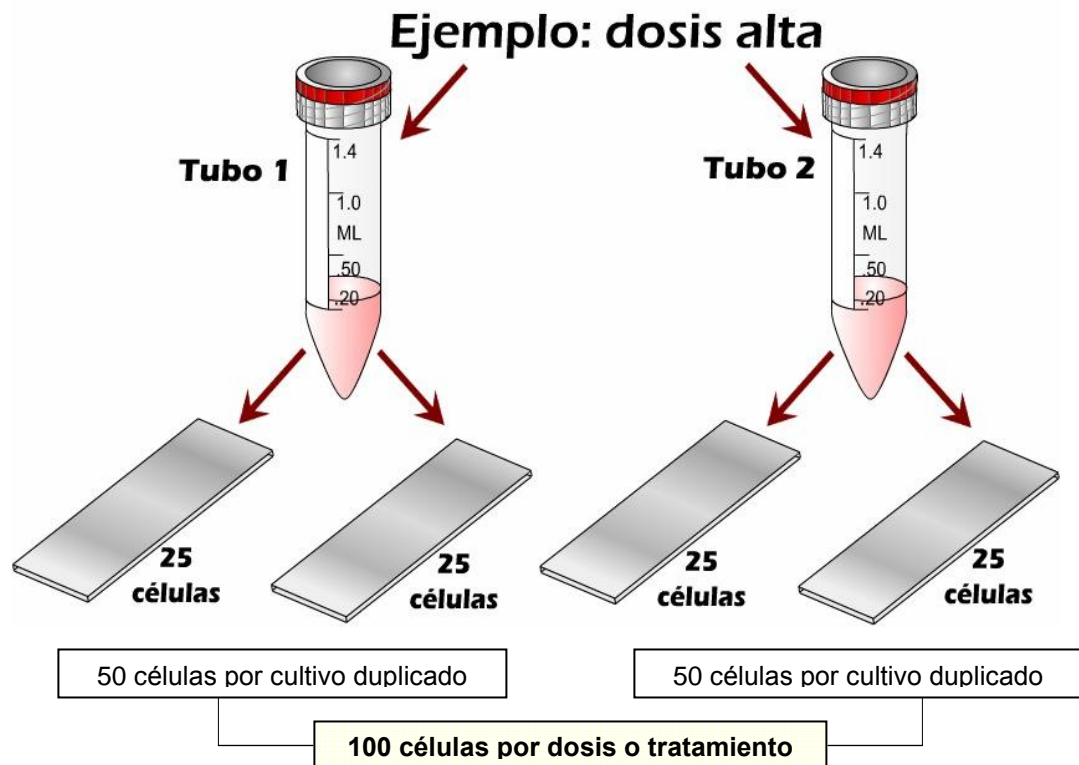
7.6.6 Análisis de las placas al microscopio, registro y procesamiento de los datos. Los Cometas teñidos en los geles se visualizaron y examinaron a una magnificación de 400x usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400), equipado con un filtro de excitación BP 546/10 nm, un filtro de barrido de 590 nm y una lámpara de mercurio de 100W. Las placas se analizaron codificadas, por el método del “ciego”.

Para el análisis, se evaluaron 50 linfocitos seleccionados aleatoriamente por cultivo (25 células por cada una de las placas duplicadas), es decir 100 células por dosis (tratamiento) (Figura 6). No se registraron Cometas que se encontraban al borde de las placas, y se colectaron los datos de las dos placas [171]. La imagen fluorescente del Cometa se capturó y guardó con una cámara digital (SONY Cyber-shot), transferida al computador y posteriormente transformada del formato de archivo JPEG a TIFF. Las células apoptóticas (cabeza pequeña con cola larga y globular) fueron seleccionadas y capturadas separadamente como medida de citotoxicidad, pero no se incluyeron en la medición por el sistema de análisis de imagen.

Se usó un sistema de análisis de imagen computarizado, el programa CASP 1.2.2 Comet Assay Software Project; University of Wroclaw [98] para analizar varios parámetros de medición del Cometa. Este programa divide a la célula en cabeza y cola, asumiendo que la forma de la cabeza es circular, y considerando todo lo exterior a la circunferencia de la cabeza como la cola del Cometa. El parámetro principal escogido para la medición, fue el valor del momento de cola. Sin embargo, como el daño producido por radicales de oxígeno induce colas de longitudes similares, pero con intensidad variable [6], se decidió incluir para el

análisis, la evaluación del porcentaje de ADN en la cola; además de considerarse éste, como el parámetro más apropiado para análisis del daño en el ADN, ya que disminuye la variabilidad existente entre cada electroforesis y entre cada experimento, en comparación al parámetro longitud de cola [44].

Figura 6. Diseño esquemático del registro de células por dosis (tratamiento), para la evaluación del daño genético en el ensayo cometa



7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la prueba de citotoxicidad, como paso previo al análisis se aplicó la prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilk, y la prueba de Levene para determinar homogeneidad de varianzas. Los resultados de estas pruebas indicaron que los datos se apartan significativamente de una distribución normal, por lo que se asumió una prueba no paramétrica, como la más adecuada para su utilización en el análisis de estos datos. Finalmente, se usó la prueba de correlación de Spearman para determinar si existe algún tipo de asociación entre el porcentaje de viabilidad celular y las

concentraciones de tiner evaluadas. Mediante este análisis se identificó la ecuación de regresión respectiva y el coeficiente de determinación.

Para el análisis estadístico del ensayo Cometa, se determinó la mediana de los valores de momento de cola (μm) y porcentaje de ADN en la cola (%) para cada cultivo. El dato por cada cultivo, se tomó como base para los análisis estadísticos [104]. La mediana se usó como medida de resumen de cada cultivo porque es menos vulnerable que la media a valores extremos ocasionales observados típicamente en poblaciones celulares con distribuciones altamente sesgadas del momento de cola entre las células [7]. Los valores promediados de las medianas representan cada concentración evaluada, y expresan una distribución normal de acuerdo al teorema del límite central [140]. Se empleó un análisis de varianza factorial de una vía para determinar una respuesta genotóxica inducida por el tratamiento con tiner. Como se obtuvo un valor F significativo $P \leq 0.05$, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak para determinar las diferencias significativas entre las concentraciones de tiner y el grupo control (DMSO) [104]. También se aplicó la prueba de correlación de Pearson para determinar si existió algún tipo de asociación entre el efecto genotóxico y las concentraciones de tiner evaluadas. Mediante este análisis se identificó la ecuación de regresión respectiva y el coeficiente de determinación. Finalmente, para determinar si hubo un impacto significativo debido a la reparación del ADN (recuperación), se aplicó la prueba “*t*” *student* pareada, que permitió evaluar el efecto entre el período de recuperación (sin y con), entre las concentraciones de tiner (alta, media y baja).

Todos los datos obtenidos en las pruebas de citotoxicidad y ensayo Cometa se analizaron usando las funciones estadísticas y gráficas del programa estadístico SigmaStat versión 3.1 y SPSS versión 11.5 para Windows, respectivamente, con un nivel máximo de significancia de 0,05 y una potencia de la prueba del 80%.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Cuadro 3. Diseño experimental del estudio: prueba de citotoxicidad y ensayo Cometa

GRUPOS TTO	PRUEBA CITOTOXICIDAD ^(f)						ENSAYO COMETA ^(f)									
	Diluciones ^(a)	VOLUMEN (μ L)			Dosis (μ L/mL)	N° de cultivos ^(d)	Tratamientos ^(e)		VOLUMEN (μ L)			Dosis (μ L/mL)	N° células/mL por placa	N° placas por tto ^(g)	Viabilidad celular ^(h)	N° células analizadas por tto ⁽ⁱ⁾
		Medio RPMI 1640 ^(c)	Susp celular	Tto			Químico	Período de recuperación	Medio RPMI 1640 ^(c)	Susp celular	Tto					
Control negativo	DMSO ^(b)	108-118	80-90	2	0,000	10	DMSO ^(b)	Con	108-118	80-90	2	0,000	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
								Sin	108-118	80-90	2	0,000	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
Grupo experimental	Dilución 9	108-118	80-90	2	0,025	10	Dosis baja	Con	108-118	80-90	2	0,050	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
	Dilución 8	108-118	80-90	2	0,05	10		Sin	108-118	80-90	2	0,050	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
	Dilución 7	108-118	80-90	2	0,100	10										
	Dilución 6	108-118	80-90	2	0,200	10	Dosis media	Con	108-118	80-90	2	0,100	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
	Dilución 5	108-118	80-90	2	0,400	10		Sin	108-118	80-90	2	0,100	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
	Dilución 4	108-118	80-90	2	0,600	10										
	Dilución 3	108-118	80-90	2	0,800	10	Dosis alta	Con	108-118	80-90	2	0,200	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
	Dilución 2	108-118	80-90	2	1,000	10		Sin	108-118	80-90	2	0,200	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
Dilución 1	108-118	80-90	2	1,200	10											
Control positivo	H ₂ O ₂	108-118	80-90	2	40 μ M	10	H ₂ O ₂	Con	108-118	80-90	2	40 μ M	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300
								Sin	108-118	80-90	2	40 μ M	1x10 ⁴	12	≥ 85%	300

^a Tratamiento por 4 horas a 37°C

^b Dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración final en el cultivo del 1%

^c Suplementado, libre de suero bovino fetal

^d Teniendo en cuenta que son 2 cultivos por tratamiento y 5 repeticiones del experimento

^e Tratamiento por 1 hora a 37°C

^f N° células sembradas / mL de cultivo: 3 x 10⁵

^g Teniendo en cuenta que las placas duplicadas se tomaron de cada cultivo duplicado (4 placas por tratamiento) y que fueron 3 repeticiones del experimento

^h Por exclusión con azul de tripano en hemocitómetro

ⁱ Teniendo en cuenta que se registraron 25 células por placa (100 por tratamiento) y que fueron 3 repeticiones del experimento

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

8. RESULTADOS

8.1 ENSAYOS PRELIMINARES Y PRUEBA DE CALIBRACIÓN

Previamente al establecimiento de la prueba de citotoxicidad, se llevaron a cabo ensayos preliminares, tales como el registro del índice mitótico (IM) y del porcentaje de viabilidad celular en cultivos de sangre total y linfocitos aislados respectivamente, para determinar el rango de concentraciones de tiner a utilizar, rango en el cual no se altera la densidad ni la proliferación celular (datos no mostrados). Los resultados de estos ensayos permitieron establecer que el rango de exposición más adecuado para evaluar la citotoxicidad inducida *in vitro* por el tiner es de 0,025 – 1,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

La calibración a diferentes concentraciones de H_2O_2 (control positivo) en un rango de 20 - 80 μM , determinó que bajo las condiciones experimentales y del químico empleado, la concentración de 40 μM es la más adecuada para evaluar el daño genético, pues a concentraciones mayores se observa un incremento en la muerte celular (datos no mostrados). De hecho, autores como Marini *et al.* [109] y Fenech *et al.* [60] han demostrado que linfocitos humanos expuestos al H_2O_2 en concentraciones mayores o iguales a 50 μM , revelan un daño apoptótico.

También se establecieron pruebas preliminares del ensayo Cometa para comprobar el óptimo funcionamiento de los equipos y el buen estado de los reactivos, lo que sirvió además para corregir problemas técnicos y de manipulación durante el establecimiento de la prueba, tales como la disminución del background en los geles, el ajuste de la densidad celular en cada gel, el mejoramiento en la definición de las células en la placa y la captura digital de las imágenes.

8.2 EFECTO CITOTÓXICO EN LINFOCITOS POR EXPOSICIÓN AGUDA AL TÍNER

En la tabla 2 se reporta el porcentaje de viabilidad celular de linfocitos humanos cultivados *in vitro* después de 4 horas de tratamiento con tiner. Cuando los linfocitos se expusieron a la concentración más alta de tiner (1,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$), la viabilidad celular disminuyó hasta en un 66%, mientras que con la concentración más baja de tiner (0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$), la viabilidad se redujo hasta en un 92.5%. El rango de concentraciones entre 0,025 y 0,600 $\mu\text{L}/\text{mL}$ presentó una viabilidad celular mayor al 75%, viabilidad recomendada para evaluar el daño genético mediante el ensayo Cometa.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Tabla 2. Viabilidad celular (%) de linfocitos humanos expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones de tiner. Se reporta el resultado obtenido en 5 repeticiones, con su respectiva media (\bar{X}) y su error estándar (EE)

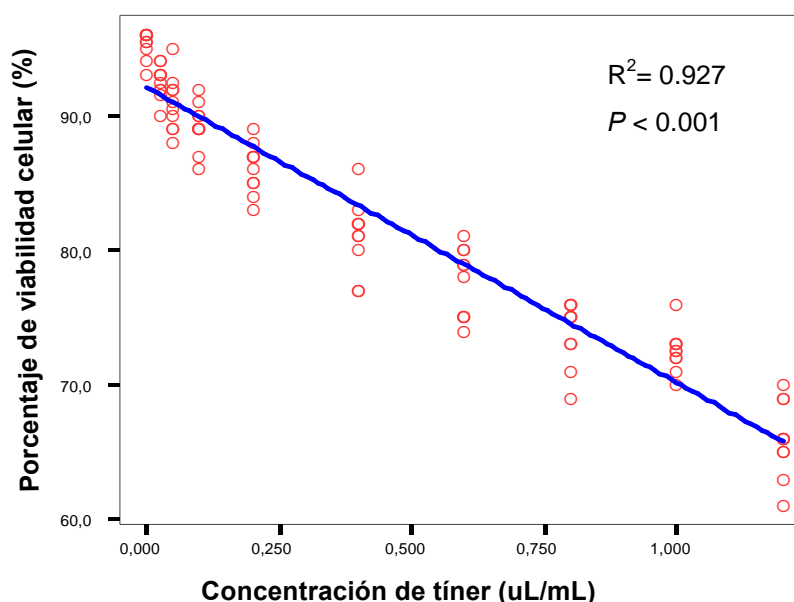
Concentración $\mu\text{L/mL}$	Porcentaje de Viabilidad (%)*					$\bar{X} \pm \text{EE}^{**}$
	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	
0,000	95.5	94.5	95.0	95.7	95.7	95.3±0.327
0,025	93.0	92.5	92.7	93.5	90.7	92.5±0.380
0,050	93.5	88.5	91.7	91.0	89.7	90.9±0.653
0,100	91.5	88.0	89.0	89.5	88.0	89.2±0.554
0,200	87.5	87.0	84.5	87.5	84.0	86.1±0.586
0,400	80.0	83.5	81.0	79.5	81.5	81.1±0.849
0,600	80.5	76.0	77.0	75.0	79.5	77.6±0.819
0,800	75.5	70.0	74.0	74.0	76.0	73.9±0.752
1,000	72.7	74.5	71.2	71.5	72.5	72.5±0.494
1,200	65.0	68.0	67.0	64.5	65.5	66.0±0.882

* Cada dato representa el promedio del porcentaje de viabilidad celular de dos cultivos.

** Porcentaje de viabilidad promedio \pm error estándar, resultado de analizar 10 cultivos/concentración.

Mediante el análisis de correlación de Spearman se identificó una asociación lineal negativa significativa estadísticamente entre las concentraciones de tiner (rango entre 0,025 a 1,200 $\mu\text{L/mL}$) y el porcentaje de viabilidad celular ($R = -0.976$, $P < 0.001$), es decir, un incremento en la tasa de muerte celular al aumentar la dosis en un período de exposición de 4 horas. Así mismo, al evaluar el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.927$), se infiere que la variabilidad en el porcentaje de viabilidad celular, correspondiente al 93%, es consecuencia de la exposición al tiner (Figura 7).

Figura 7. Citotoxicidad aguda en linfocitos humanos. Porcentaje de viabilidad celular después de 4 horas de exposición *in vitro* al tiner



La ecuación lineal ($y = a + bx$) que describe la relación de dependencia entre el porcentaje de viabilidad y la concentración de tiner es la siguiente:

Porcentaje de viabilidad = $92.11 - 21.95$ (concentración de tiner).

El criterio de selección de las dosis empleadas para evaluar el daño genético a partir de los resultados obtenidos en la prueba de citotoxicidad, se basó en la elección de aquellas concentraciones que presentaron un promedio de porcentaje de viabilidad celular mayor del 85%. Por esta razón, las concentraciones de tiner seleccionadas como dosis baja, media y alta para la aplicación del ensayo Cometa fueron 0,050; 0,100 y 0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Aunque las concentraciones entre los rangos de 0,400 y 0,600 $\mu\text{L}/\text{mL}$ presentaban una viabilidad celular por encima del 75% (viabilidad recomendada por Henderson *et al.* [76] para evaluar el daño genético mediante el ensayo Cometa), estas no se seleccionaron; porque la elección de una viabilidad celular mayor garantiza una adecuada evaluación del daño genético, permitiendo de esta manera, controlar la aparición de falsos positivos por un efecto citotóxico.

8.3 DAÑO GENÉTICO EN LINFOCITOS POR EXPOSICIÓN AL TÍNER

La tabla 3 resume los valores promedio de daño en el ADN inducidos por el tiner, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, después de 1 hora de tratamiento. Los parámetros de momento de cola y porcentaje de ADN en la cola, evidenciaron una diferencia significativa estadísticamente ($P < 0.001$) en el daño al ADN de linfocitos expuestos al tiner, con respecto al control negativo (DMSO).

Tabla 3. Daño genético inducido por el tiner en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, evaluado a través del ensayo Cometa

ENSAYO COMETA			
Tratamientos	Dosis ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Momento de cola Promedio (μm) $\pm\text{EE}^*$	Porcentaje ADN en la cola Promedio (%) $\pm\text{EE}^*$
DMSO	0,000	$1,63 \pm 1,578$	$4,96 \pm 0,208$
Baja	0,050	$14,34 \pm 1,233$	$21,05 \pm 1,086$
Media	0,100	$13,36 \pm 1,367$	$25,99 \pm 2,141$
Alta	0,200	$38,29 \pm 3,363^a$	$34,77 \pm 1,808^a$
H ₂ O ₂	40 μM	$66,06 \pm 3,168^a$	$36,72 \pm 3,534^a$
Análisis estadístico**		$F = 260.910; P < 0.001$	$F = 72.324; P < 0.001$

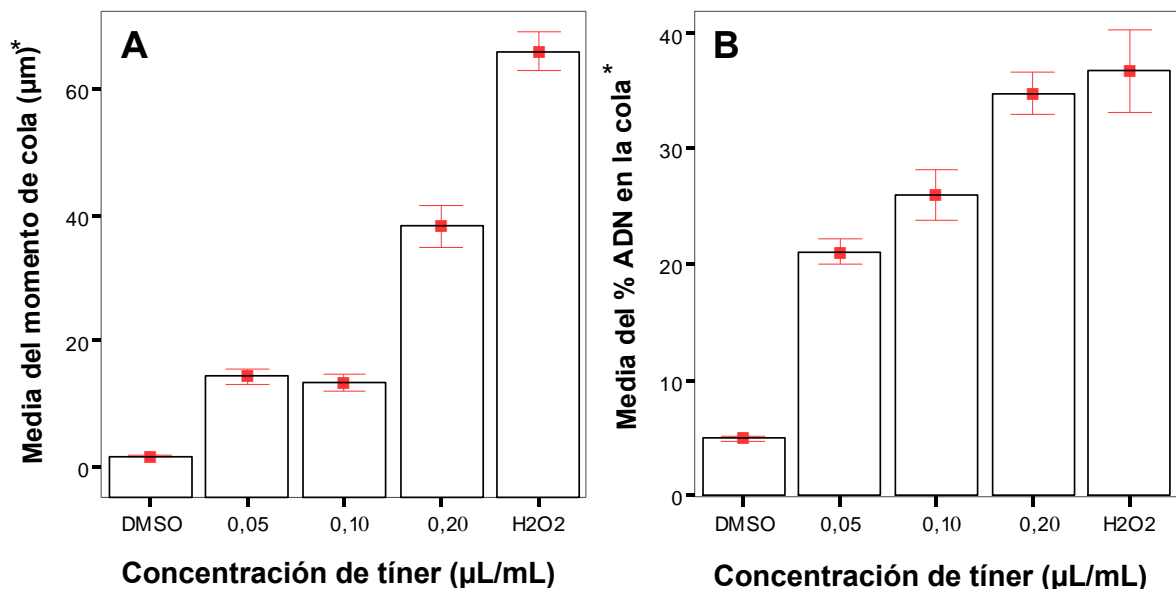
* Los datos corresponden al promedio de las medianas \pm error estándar (EE) obtenidas del análisis de 50 células por cultivo (100 células por tratamiento) y 3 repeticiones del experimento.

** La comparación entre los tratamientos se realizó mediante ANOVA de una vía ($P < 0.001$).

^a Corresponde a los tratamientos con los valores más altos, que difieren significativamente del control negativo (DMSO), según la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak ($P < 0.05$).

Mediante análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak se establece que las concentraciones de tiner (0,050; 0,100 y 0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y el control positivo (H_2O_2), incrementan el daño en el ADN de linfocitos, con respecto al control negativo (DMSO). En la figura 8 se puede apreciar, que mediante el parámetro de momento de cola, los valores promedio ($\pm\text{EE}$) de daño genético de linfocitos expuestos a las dosis baja ($14,34 \mu\text{m} \pm 1,233$) y media ($13,36 \mu\text{m} \pm 1,367$) son muy semejantes. Mientras que en el porcentaje de ADN en la cola, la semejanza esta dada entre los valores promedio de daño genético a dosis alta ($34,77\% \pm 1,808$) y con H_2O_2 ($36,72\% \pm 3,534$).

Figura 8. Valores promedio de momento de cola (A) y porcentaje de ADN en la cola (B) inducidos por el tiner en linfocitos humanos cultivados *in vitro*

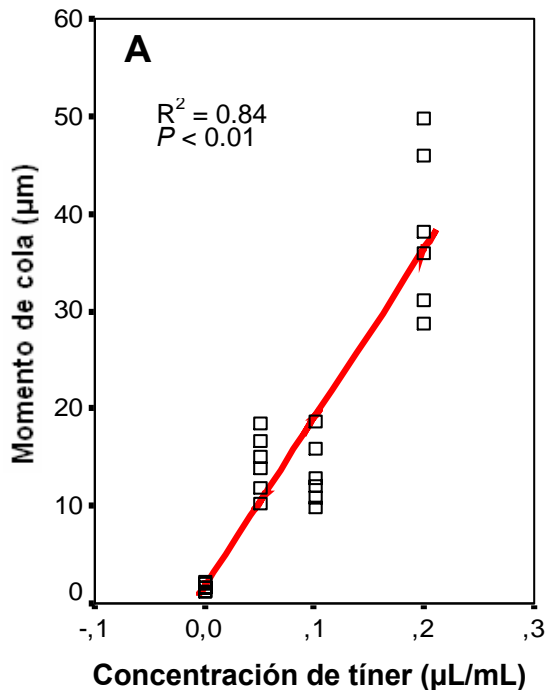


* Representación gráfica de las medias. Los intervalos muestran las medias $\pm 1,0$ error estándar

Mediante el análisis de correlación de Pearson se logra establecer una asociación lineal significativa estadísticamente para el momento de cola ($R= 0.917$; $P < 0.01$) y para el porcentaje de ADN en la cola ($R= 0.897$; $P < 0.01$). Dicha asociación se caracteriza por una relación dosis-efecto positiva entre el daño al ADN, evaluado con los dos parámetros, y las dosis de tiner de 0,050 a 0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Así mismo, al evaluar los coeficientes de determinación del momento de cola ($R^2= 0.84$) y del porcentaje de ADN de cola ($R^2= 0.81$), se infiere que la variabilidad observada en ambos parámetros de daño, correspondiente al 84 y 81% respectivamente, es consecuencia de la exposición a diferentes dosis de tiner (Figura 9).

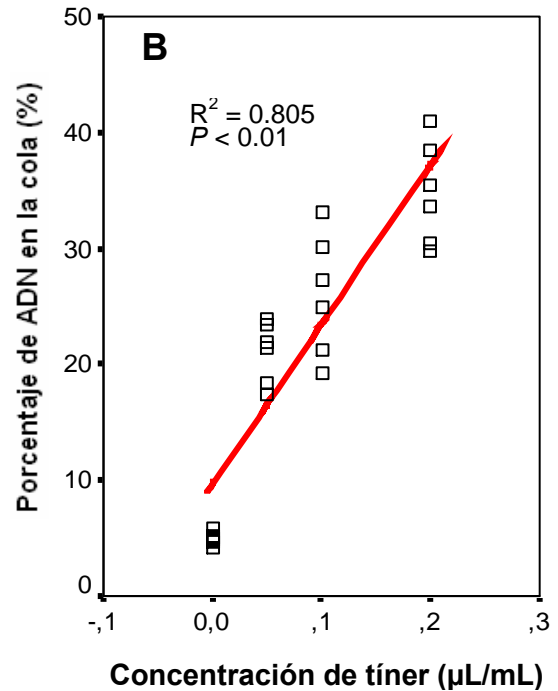
Las gráficas y ecuaciones que permiten precisar la relación de dependencia entre los parámetros de daño genético evaluados por el ensayo Cometa y la concentración de tiner, se muestran en la figura 9.

Figura 9. Estimación curvilínea del daño genético evaluado mediante el momento de cola (A) y porcentaje de ADN en la cola (B), en linfocitos de sangre periférica inducido *in vitro* por el tiner



Ecuación lineal ($y = a + bx$)

Momento de cola = $1.728 + 173.47$ (concentración tiner)



Ecuación lineal ($y = a + bx$)

% ADN en cola = $9.64 + 137.749$ (concentración tiner)

En las figuras 10 y 11 se muestra el daño al ADN (morfología del Cometa) inducido por el tiner en linfocitos humanos. Aunque en este estudio, no se realizó un análisis cualitativo por categorías de daño, se identificaron diferentes tipos de daño en el ADN inducido por el tiner mediante el ensayo Cometa. Las imágenes obtenidas en la prueba, evidencian la presencia de quiebres de cadena y sitios lábiles al álcali en la molécula de ADN, por la formación de Cometas con cabeza y cola, después de la migración de fragmentos de ADN hacia el ánodo durante la electroforesis. Las células que no presentan daño genético por exposición al tiner, mantienen una forma semicircular, donde la mayor parte del ADN se ubica dentro de la cabeza, pues no hubo migración de fragmentos de esta molécula (Figura 11A). También se muestran células con baja y alta migración de ADN fuera de la cabeza (Figura 11B -11C).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Figura 10. Vista panorámica de linfocitos humanos tratados *in vitro* con tóner (200X), y coloreados con Bromuro de Etidio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

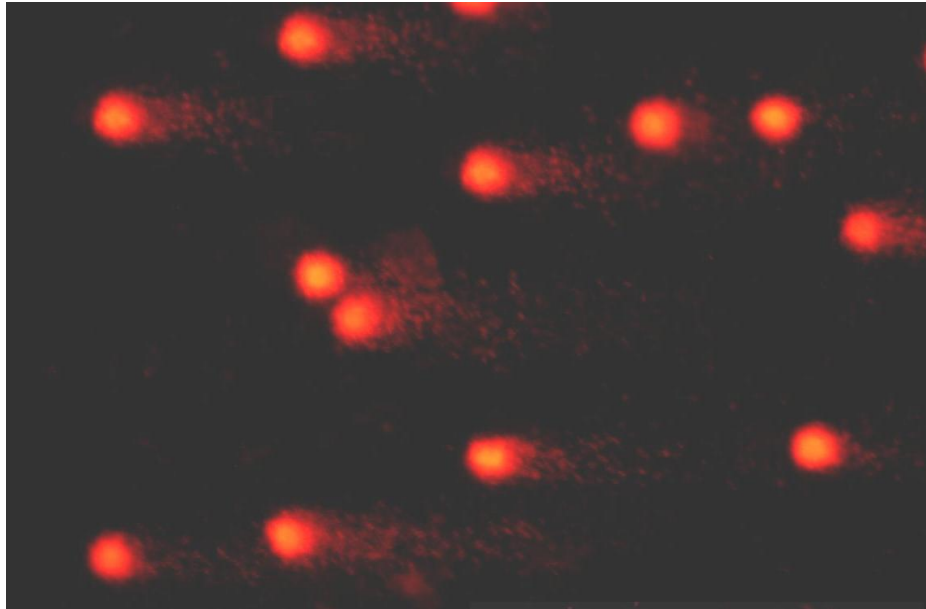
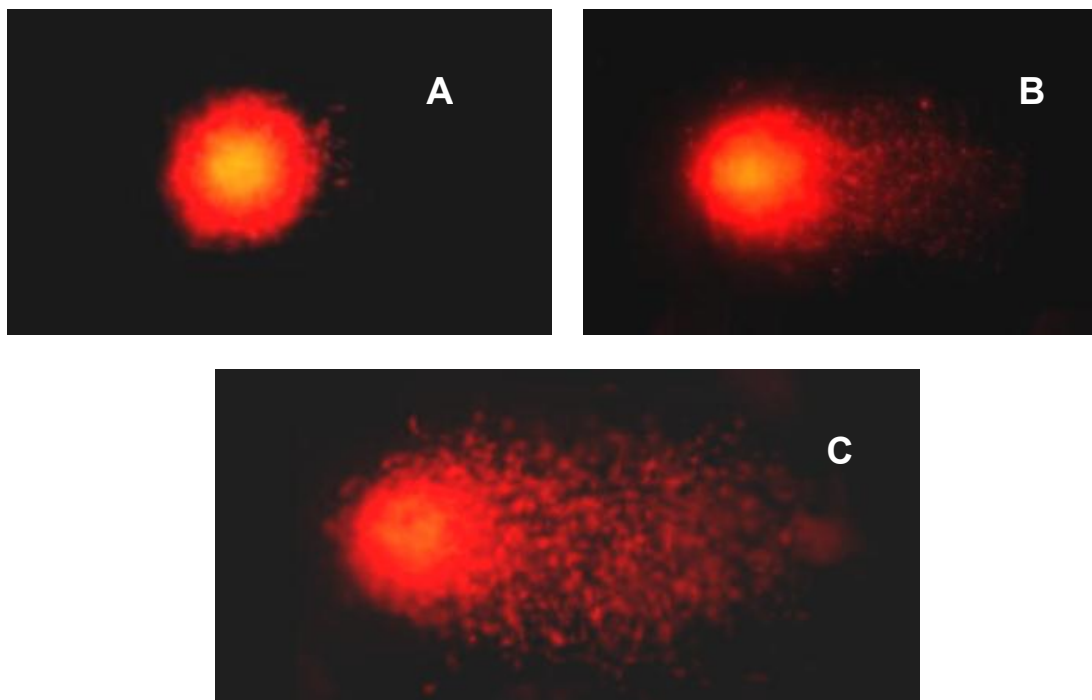


Figura 11. Morfología del Cometa (linfocito). A) Linfocito tratado, sin daño genético. B) Linfocito tratado, con daño genético bajo. C) Linfocito tratado, con daño genético alto



pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

8.4 EFECTO DE LA REPARACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR EXPOSICIÓN AL TÍNER, DESPUÉS DE UN PERÍODO DE RECUPERACIÓN

Mediante la prueba “*t*” *student* pareada, se logra establecer que durante el período de recuperación de 4 horas, los linfocitos reparan los daños inducidos en el tratamiento con tíner y H₂O₂, puesto que los valores promedio de momento de cola y porcentaje de ADN en la cola registrados en los linfocitos con período de recuperación, son significativamente menores ($P < 0.05$) que los valores promedio registrados en los linfocitos sin período recuperación. Sin embargo, se logra estimar que no hay una diferencia significativa estadísticamente ($t = 1.306$; $P = 0.249$) en el efecto de la recuperación del daño en el ADN inducido por la dosis media de tíner (0,100 $\mu\text{L}/\text{mL}$), evaluada mediante el momento de cola (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la recuperación en función a la reparación del daño en el ADN en linfocitos humanos, inducido *in vitro* por el tíner

Dosis ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	EFECTO DE LA RECUPERACIÓN					
	Momento de cola Promedio (μm) $\pm\text{EE}^*$		Análisis estadístico**	Porcentaje ADN en la cola Promedio (%) $\pm\text{EE}^*$		Análisis estadístico**
	Sin	Con		Sin	Con	
DMSO	1,63 \pm 0,16	0,76 \pm 0,12	$t = 4.373$; $P = 0.007$	4,96 \pm 0,21	2,94 \pm 0,36	$t = 3.991$; $P = 0.010$
0,050	14,34 \pm 1,23	10,02 \pm 0,59	$t = 3.617$; $P = 0.015$	21,05 \pm 1,09	12,91 \pm 1,02	$t = 6.921$; $P < 0.001$
0,100	13,36 \pm 1,37	11,20 \pm 0,68	$t = 1.306$; $P = 0.249^a$	25,99 \pm 2,14	14,98 \pm 1,43	$t = 9.253$; $P < 0.001$
0,200	38,30 \pm 3,36	20,31 \pm 2,04	$t = 12.156$; $P < 0.001$	34,77 \pm 1,81	23,05 \pm 0,88	$t = 5.666$; $P = 0.002$
H ₂ O ₂	66,06 \pm 3,17	10,95 \pm 0,70	$t = 18.201$; $P < 0.001$	36,72 \pm 3,53	14,67 \pm 1,34	$t = 6.926$; $P < 0.001$

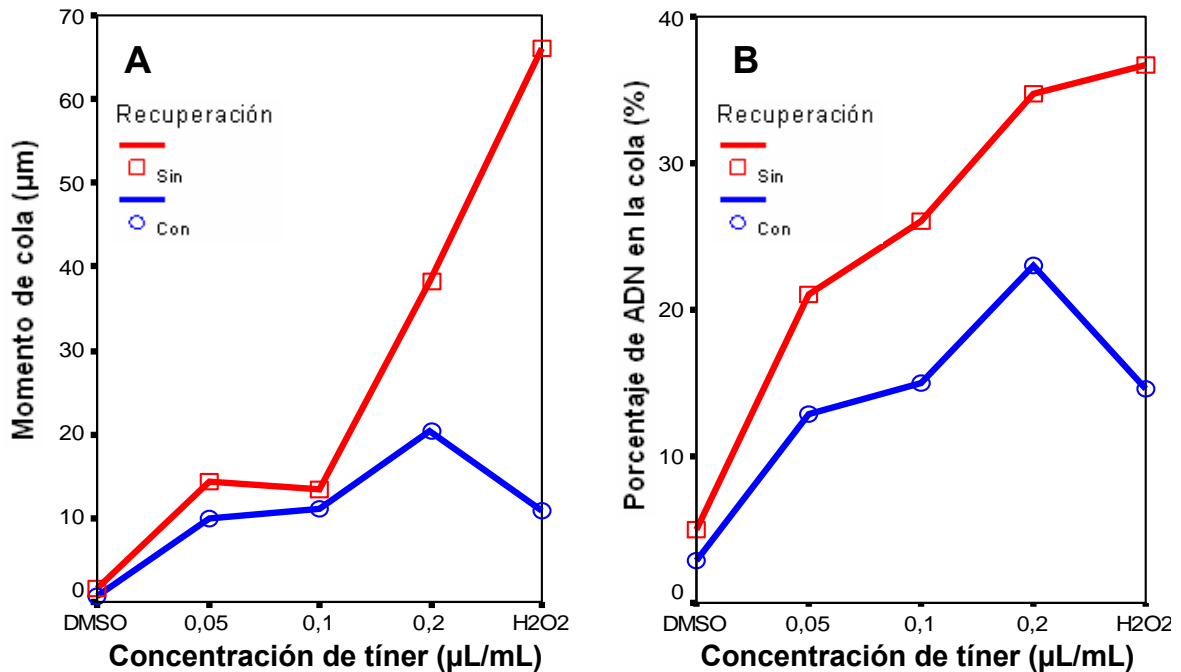
* Los datos corresponden al promedio de las medianas \pm error estándar (EE).

** Efecto del período de recuperación (con y sin) determinado mediante una prueba “*t*” pareada.

^a No significativo estadísticamente.

Entre los valores promedio de momento de cola de las células tratadas con tíner, la dosis alta (0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) fue la que presentó un marcado efecto en la reparación del daño durante el período de recuperación. El promedio ($\pm\text{EE}$) de momento de cola en la dosis alta de tíner fue de 38,30 \pm 3,36 μm antes del período de recuperación, mientras que después del período de recuperación fue de 20,31 \pm 2,04 μm ($t = 12.156$; $P < 0.001$), evidenciando una reducción significativa del daño en el ADN (con una diferencia de 18,01 μm). Igualmente, entre los valores promedio de porcentaje de ADN en la cola de las células tratadas con tíner, la dosis alta (0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) también presentó un notable efecto en la reparación del daño durante el período de recuperación. Aquí, el promedio ($\pm\text{EE}$) del porcentaje de ADN en la cola fue de 34,77 \pm 1,81 % sin período recuperación, y de 23,05 \pm 0,88 % con período de recuperación ($t = 5.666$; $P = 0.002$), lo que evidencia la reducción significativa del daño genético después del período de recuperación (con una diferencia de 11,72 %).

Figura 12. Comportamiento de los valores promedio de momento de cola (A) y de porcentaje de ADN en la cola (B), en linfocitos humanos tratados *in vitro* con tíner, sin y con período de recuperación de 4 horas



En la figura 12, se logra apreciar que entre los tratamientos, el que indujo mayor daño genético fue el H₂O₂, evaluado mediante el momento de cola y el porcentaje de ADN en la cola, presentando valores promedio (\pm EE) de $66,06 \pm 3,17 \mu\text{m}$ y $36,72 \pm 3,53 \%$, respectivamente. A su vez, el tratamiento con H₂O₂ fue el que mejor respondió después del período de recuperación con una mayor expresión de la reparación del daño al ADN, presentando promedios de $10,95 \pm 0,70 \mu\text{m}$ para momento de cola y de $14,67 \pm 1,34 \%$ para porcentaje de ADN en la cola.

En la figura 12B se observa que mediante el porcentaje de ADN en la cola, la dosis alta de tíner (0,200 $\mu\text{L/mL}$) con un promedio de $34,77 \pm 1,81 \%$, induce un daño genético semejante al del H₂O₂ con un promedio de $36,72 \pm 3,53 \%$. Sin embargo, la respuesta en la reparación del daño para las células tratadas con la dosis alta y el H₂O₂, no presentó un comportamiento similar al observado en la inducción del daño genético. En la dosis alta de tíner la reparación del daño fue menor ($23,05 \pm 0,88 \%$) a la observada en el tratamiento con H₂O₂ ($14,67 \pm 1,34 \%$), con una diferencia de daño en el ADN después del período de recuperación de $11,72\%$ para la dosis alta y de $22,05\%$ para el H₂O₂, lo que demuestra su diferencia en la eficiencia de reparación. Con respecto al efecto de la recuperación a dosis baja (0,050 $\mu\text{L/mL}$) y media (0,100 $\mu\text{L/mL}$) de tíner, se observó que proporcionalmente, el parámetro de porcentaje de ADN en la cola, expresa mejor la reparación del ADN después del período de recuperación.

Como dato adicional, mediante el estudio previo de la variabilidad individual determinada por los polimorfismos genéticos, utilizando las técnicas de PCR multiplex y PCR/RFLPs, el donante presentó el siguiente genotipo: CYP2E1 silvestre; GSTT1 positivo y GSTM1 nulo, para las enzimas del metabolismo; XRCC1 (Arg²⁸⁰/His²⁸⁰) silvestre; XRCC1 (Arg¹⁹⁴/Trp¹⁹⁴) silvestre; XRCC1 (Arg³⁹⁹/Gln³⁹⁹) heterocigoto y XRCC3 (Thr²⁴¹/Met²⁴¹) silvestre, para las enzimas de reparación del ADN.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

9. DISCUSIÓN

Estudios de biomonitorio han revelado el potencial genotóxico de los solventes orgánicos en poblaciones expuestas ocupacionalmente, empleando biomarcadores citogenéticos de efecto temprano como alteraciones cromosómicas (AC`s), intercambio de cromátides hermanas (ICH`s) y micronúcleos (Mn`s). Luego, es interesante acudir a la experimentación mediante la implementación de estudios *in vitro*, los cuales pueden proporcionar nuevos conceptos y a su vez confirmar o rechazar experimentalmente ciertas hipótesis planteadas en estudios epidemiológicos [170]. Dado que en Popayán, la exposición ocupacional a solventes orgánicos exhibe una asociación directa con el incremento de alteraciones cromosómicas en personas expuestas, y que el tiner es la mezcla más empleada entre los trabajadores [78]; resultó interesante evaluar el tiner a nivel *in vitro*, por ser el posible responsable de los efectos genotóxicos observados en personas expuestas, así como la aplicación de pruebas tan novedosas como el ensayo Cometa.

9.1 DE LA METODOLOGÍA

Actualmente, una de las pruebas más utilizadas para evaluar el daño genético de químicos y mezclas complejas, es el ensayo Cometa alcalino. En el presente estudio se empleó esta prueba para evaluar el daño genético inducido por el tiner en linfocitos humanos, basándose en las “directrices para el uso del ensayo Cometa *in vitro* en la toxicología genética” establecidas por Tice *et al*, [171] y soportadas en revisiones bibliográficas sobre esta técnica, dentro de las que se incluyen las realizadas por Kelvey-Martin *et al*. [94]; Fairbairn *et al*. [57]; Rojas *et al*. [149] y Collins [34].

El diseño experimental *in vitro* de este estudio tuvo en cuenta ciertos aspectos importantes para el análisis estadístico de los datos, tales como: establecer cultivos duplicados por ensayo y repeticiones de los experimentos para fortalecer el tamaño de la muestra; registrar 50 células por cultivo (100 por tratamiento) para disminuir la variabilidad de los datos entre las placas; e identificar al cultivo como la unidad experimental para el análisis estadístico, en lugar de las células [104]. El ensayo Cometa es una prueba en proceso de validación, razón por la cual se hace necesario seguir con rigor las directrices internacionales, además de ajustar experimentalmente aspectos particulares, como: evitar el daño mecánico de las células cortando las puntas de los tips; salvaguardar la integridad del gel evitando la formación de burbujas durante la preparación de las placas; conservar un buen

lavado de los geles para evitar el background durante el registro de los Cometas; y definir el empleo de una misma cámara de electroforesis y fuente de poder, durante todo el estudio para evitar la variabilidad entre los corrimientos (electroforesis).

En este estudio se decidió trabajar con linfocitos aislados, ya que estos pueden verse afectados por las condiciones del cultivo *in vitro* con sangre total, antes de evaluar el daño generado por el tratamiento. Lo anterior, fue establecido por Narayanan *et al.* [121] quien indicó que los componentes de la sangre total causan daño en el ADN de linfocitos humanos a nivel *in vitro*, debido al posible daño oxidativo generado por los neutrófilos (granulocitos) y la lisis de eritrocitos en cultivo. Los neutrófilos en cultivo liberan varias especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) hacia el ambiente extracelular, y en adición, la lisis de eritrocitos libera en el medio grandes cantidades de hemoglobina (iones de hierro), superóxido y H₂O₂, que al unirse covalentemente con el material genético, causan daño oxidativo en el ADN de linfocitos. En el caso del hierro contenido en el anillo hemo de la hemoglobina, se conoce que este metal de transición tiene un papel clave en el daño celular inducido por ROS, dada su función en la producción de especies muy agresivas (como el radical hidroxil) mediante reacciones Fenton [81].

Por otro lado, la calibración del peróxido de hidrógeno (control positivo) es un aspecto muy importante para la selección de una dosis que garantice la correcta evaluación del daño genético, mas no de daño citotóxico; en este caso la dosis elegida fue de 40 µM. De igual manera permite controlar que las condiciones de la prueba fueran las óptimas, al permitir la observación y registro individual de los Cometas. Se ha demostrado que linfocitos humanos expuestos a concentraciones ≥ 50 µM de H₂O₂, revelan una alta fragmentación del ADN, producto de un daño apoptótico [60, 109]. Por consiguiente el uso de concentraciones por debajo de 50 µM de H₂O₂, en cierto modo garantiza y revela un efecto genotóxico.

El protocolo de citotoxicidad aguda, aplicado en este estudio, se basó en una modificación del micrométodo en placas de 96 pozos establecido por el Dr. Michael Plewa [140], y permitió que en un tiempo de incubación de 24 horas (antes del tratamiento) se alcance una adecuada densidad celular y un amplio porcentaje de células en fase S del ciclo celular, antes de la exposición al tiner; pues se conoce que en dicha fase actúan la gran mayoría de agentes clastogénicos, catalogados como S-dependientes [15].

La metodología en la cual las células se someten a un período de recuperación de 4 horas (después de 1 hora de tratamiento), para que las lesiones del ADN sean reparadas, ha sido utilizada por varios autores para demostrar la capacidad de reparación del ADN después de exponer las células a agentes clastogénicos (genotóxicos) [147, 153]. Sin embargo la implementación de dicha metodología en esta investigación no solo permite evaluar la capacidad de reparación de las

células tratadas con tiner y H_2O_2 , sino también permite determinar que la migración del ADN es debida a un daño genético reparable y no a una fragmentación nuclear apoptótica irreparable por efecto citotóxico [150]. Cabe destacar que para evaluar la reparación del daño en el ADN, es necesario que los linfocitos humanos sean estimulados con fitohemaglutinina (por 24 horas antes del tratamiento) para inducir la proliferación y la generación de precursores de ADN (DNTP's) que permitan realizar eficazmente los procesos de reparación [33] en el posterior período de recuperación.

El momento de cola y porcentaje de ADN en la cola son los parámetros de medición de daño genético, más empleados para el análisis de genotoxicidad de compuestos mediante el ensayo Cometa. Sin embargo, el porcentaje de ADN en la cola es el parámetro más recomendado para evaluar el daño producido por compuestos que inducen estrés oxidativo [6], como los solventes orgánicos. En el presente estudio la evaluación mediante el parámetro de porcentaje de ADN en la cola, permite evidenciar al igual que el momento de cola, el daño genético inducido por el tiner, pero además permite observar una mayor diferencia entre el daño sin y con período de recuperación. De hecho, el efecto de la recuperación puede reflejarse mejor en el porcentaje de ADN en la cola, y esto probablemente se deba a que el parámetro momento de cola (por ser el producto del porcentaje de ADN en la cola y longitud de cola), se vio influenciado por la variabilidad de la longitud de cola, inducido por este tipo de compuestos. Se ha sugerido que la principal ventaja del momento de cola es que la cantidad de ADN migrado y la distancia de migración se representan en un solo valor [18]. Sin embargo, las colas de los Cometas con diferentes longitudes y cantidades relativas de ADN pueden tener el mismo momento de cola [75]. Con respecto al porcentaje de ADN en la cola, se puede expresar que este es relativamente un parámetro muy útil para cuantificar el daño genético, debido a que muestra una relación lineal a la frecuencia de quiebres en el ADN y permite discriminar el daño con un amplio rango de sensibilidad (en teoría de 0-100% de ADN en la cola [34, 127]).

9.2 DE LOS RESULTADOS

La exposición ocupacional a hidrocarburos monocíclicos, tales como el tolueno, xileno o estireno, es un problema de salud pública. Sin embargo, el análisis de la asociación entre la exposición a estos solventes y el riesgo de cáncer es complicado, por el hecho de que la mayoría de exposiciones ocupacionales son a una mezcla de estos hidrocarburos [86]. De hecho, muchas veces pueden existir interacciones entre varios componentes de una mezcla, pero si se quiere decidir que tipo de interacción es la observada, y si la toxicidad es aditiva, sinérgica o potencializante, se hace necesario desarrollar experimentos complementarios que garanticen dicha interpretación [138].

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Estudios de biomonitorio realizados con trabajadores expuestos a una variedad de solventes orgánicos han evidenciado una asociación entre el daño citogenético y el tiempo de exposición ocupacional [1, 32, 78, 90, 133, 135, 137, 166, 167, 187], revelando que la exposición crónica a estos compuestos en bajas dosis, es suficiente para incrementar la frecuencia de daños cromosómicos en linfocitos humanos de sangre periférica, y según Bonassi [19] relacionarse con un mayor riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer.

Sin embargo, algunos estudios *ex vivo*, *in vivo* e *in vitro* desarrollados para establecer el potencial genotóxico de los solventes orgánicos o mezclas de solventes, ampliamente utilizados a nivel mundial, han clasificado a estos compuestos con riesgo bajo a nivel genotóxico en animales y humanos [64, 91, 136, 138, 145, 148, 163, 183] a excepción del benceno, el cual se considera peligroso para la salud, aún en concentraciones bajas [130]. De hecho, el benceno es identificado como un agente altamente genotóxico, mutagénico, embriotóxico y carcinogénico [10, 28, 83, 118, 130, 180]. A este respecto, se podría hipotetizar que los resultados contradictorios sobre el daño genético inducido por los solventes orgánicos, son consecuencia de las dosis utilizadas y de la baja sensibilidad de las técnicas para determinar el impacto de dichos solventes.

En el presente estudio, la implementación de la metodología para medir la citotoxicidad aguda, el daño genético inducido por el tñner y la reparación del daño en el ADN después de un período de recuperación fue de gran utilidad, porque permitió establecer una correlación entre la dosis, la viabilidad celular y la lesión primaria en el ADN inducida por esta mezcla compleja; así como la detección de bajos niveles de daño en el genoma mediante la aplicación del ensayo Cometa alcalino. El tñner por ser una mezcla compleja de solventes, contiene: tolueno, m-xileno, p-xileno, o-xileno, hexano, 2,3-dimetilhexano, noveno, isobutano, octano y etilbenceno, según análisis cromatográficos realizados por Ecopetrol [78]

9.2.1 Citotoxicidad aguda en linfocitos expuestos al tñner

La prueba de exclusión celular con azul de tripano es usada comúnmente para evaluar cambios en la integridad o permeabilidad de la membrana, mediante el registro del número de células vivas y muertas (porcentaje de viabilidad celular). En este estudio, el análisis de la citotoxicidad aguda del tñner realizado mediante esta prueba de exclusión celular, mostró un efecto significativo dosis-respuesta negativo ($R = -0.976$, $P < 0.001$), presentando una disminución en la viabilidad celular a medida que los linfocitos eran expuestos a dosis de tñner incrementadas. La reducción en la viabilidad celular, puede ser causada por la inducción de daños estructurales o alteraciones en las funciones básicas celulares, que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis [53], posiblemente por la exposición aguda al tñner en las dosis evaluadas.

La citotoxicidad observada por esta mezcla compleja de solventes orgánicos se puede explicar por la habilidad común de los componentes individuales del tiner para interactuar con las membranas biológicas, induciendo la ruptura de la membrana y cambios en la función de proteínas integrales de la misma [155]. Las alteraciones en la membrana se pueden describir como la acumulación del solvente en medio de la bicapa lipídica, lo que se relaciona únicamente con la hidrofobicidad y lipofilicidad del compuesto, independientemente de su estructura química [47, 54]. La preservación de la integridad estructural de la membrana celular es esencial en la conservación de la homeostasis, y por consiguiente de la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos en esta investigación se relacionan con los resultados de estudios realizados por McDermott *et al.* [112] para evaluar la toxicidad de los solventes orgánicos mediante la prueba de exclusión con azul de tripano, donde se demuestra que la exposición subcrónica (5 días) *in vitro* a diferentes concentraciones de tolueno, hexano y metiletilcetona (MEK), induce una reducción dosis-dependiente en el porcentaje de viabilidad de células TJurkat y SH-SY5Y. Además, de revelar, que la potencia de los solventes se incrementa según su lipofilicidad (hexano > tolueno > MEK) considerando de este modo que la membrana celular es el blanco primario de los solventes orgánicos.

De hecho, en otro estudio empleando tejidos como la piel humana, se ha determinado que la exposición (8 horas) a concentraciones incrementadas de estireno, tolueno, acetona, xileno y percloroetileno, disminuye la viabilidad del tejido en términos de reducción en la actividad mitocondrial *in vitro*, evaluada a través del método colorimétrico con tetrazolio MTT. Indicando de este modo, que los solventes orgánicos alteran la viabilidad de tejidos humanos [39]. De manera similar, en otra investigación empleando líneas celulares (A549 derivadas de pulmón y HepG2 derivadas de hígado) y fibroblastos de piel, se ha establecido que la exposición (1 hora) *in vitro* a concentraciones incrementadas de tolueno y xileno, disminuye la viabilidad de las células de manera dosis-dependiente, y demuestra que el xileno es más citotóxico que el tolueno en los tres tipos celulares, evaluados a través de métodos colorimétricos con MTS (análogo al MTT) y NRU (técnica basada en la capacidad de células viables para incorporar el colorante rojo neutro) [11]. Demostrando de este modo, la alta sensibilidad de tejidos y células humanas frente a la exposición a solventes orgánicos, con una marcada disminución en la viabilidad.

El resultado del efecto citotóxico del tiner al parecer esta mediado por un efecto sinérgico de los componentes de dicha mezcla, según lo revelan estudios realizados por Croute y colaboradores [41], quienes evaluaron la exposición al benceno, etilbenceno, tolueno y xileno, de manera individual y como mezcla compleja, en líneas celulares humanas normales (fibroblastos) y derivadas de tumor (A549, HepG2), mediante el registro de la tasa de crecimiento celular (porcentaje de inhibición en el crecimiento) después de 4 días de exposición.

Encontrando que la citotoxicidad de los solventes orgánicos en las tres líneas celulares se correlaciona con el grado de hidrofobicidad de los compuestos evaluados; y que la mezcla de dichos solventes (cada uno a concentraciones no citotóxicas) presentan una alta citotoxicidad celular, evidenciando de esta manera el efecto sinérgico de la mezcla resultante.

Los resultados de este estudio muestran que el tñner bajo las condiciones experimentales ensayadas, presentó un efecto citotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica en condiciones *in vitro*, siendo la membrana celular blanco primario de los solventes orgánicos contenidos en el tñner. Al parecer el tñner a las dosis valoradas interactúa con estructuras celulares de importancia biológica para los linfocitos como lo es la membrana celular, la cual se ve alterada en su estructura, permeabilidad y funcionalidad. Ahora bien, con el fin de determinar si los componentes del tñner interactúan y alteran el material genético, se sometió a la evaluación del daño en el ADN, mediante el ensayo Cometa alcalino.

9.2.2 Daño genético en linfocitos expuestos al tñner

Cuando se interpretan los datos de genotoxicidad obtenidos mediante el ensayo Cometa, es importante determinar el nivel de citotoxicidad aguda después del tratamiento, para evitar falsos positivos [76]. A este respecto, cuando se analizaron con azul de tripano las alícuotas de suspensión celular tratadas con tñner, se observó que las tres dosis elegidas (0,050; 0,100 y 0,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) para evaluar genotoxicidad, exhibieron una viabilidad celular mayor o igual 85%, lo que permitió asumir que el daño observado se asocia directamente con un daño genético. Por otra parte, la reducida citotoxicidad encontrada (equivalente a un 15% de mortandad), se pudo descartar del estudio mediante la identificación morfológica de las células apoptóticas, las cuales no se incluyeron en el análisis.

En el presente estudio, se observó un incremento altamente significativo ($P < 0.001$) de daño en el ADN (medido por los parámetros de momento de cola y porcentaje de ADN en la cola) de linfocitos tratados con tñner, con respecto al control negativo. Lo que revela el efecto directo de los componentes del tñner al interactuar con los centros nucleofílicos del material genético de linfocitos humanos bajo condiciones *in vitro*, generando lesiones primarias en el ADN, como quiebres de cadena, sitios lábiles al álcali y aductos-ADN (que conducen a la formación de sitios lábiles al álcali) [129, 159]. Además, de demostrar la sensibilidad del ensayo Cometa alcalino para detectar daño genético inducido *in vitro* por el tñner.

Estos resultados permiten inferir que posiblemente los componentes del tñner inducen daño en la molécula de ADN por procesos de oxidación o alquilación, que resultan de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el

anión superóxido y radicales hidroxil, o de la presencia de agentes alquilantes en el tóner; los cuales al interactuar con el ADN (unión covalente) generan quiebres de cadena simple y/o doble, así como la formación de sitios AP (apurínicos/apirimidínicos) [24, 169]. Estos sitios AP lábiles al álcali son también convertidos a quiebres de cadena durante el período de desenrollamiento alcalino en el ensayo Cometa [99, 171].

Lo anterior es soportado por Martínez *et al.* [110], quien mediante la aplicación del ensayo Cometa alcalino en conjunto con la enzima formamidopirimidin glicosilasa-Fpg, detectó una alta fragmentación del ADN en linfocitos de ratas expuestas a vapores de tóner, además de un alto incremento de malondialdehído (producto de la peroxidación lipídica) y una reducción en la expresión de glutatión, dos biomarcadores ampliamente usados para determinar estrés oxidativo. Ahora bien, debido a que el producto de oxidación de bases más encontrado en el ADN es la 8-oxoguanina, que es el principal sustrato de la enzima Fpg, se puede asociar directamente al estrés oxidativo como el mecanismo más probable de daño en el ADN inducido por el tóner. Sin embargo, no se puede descartar que el daño genético también puede ser causado por alquilación, ya que la enzima Fpg también detecta algunos tipos de daños inducidos por agentes alquilantes [175], agentes que probablemente estén contenidos en la mezcla compleja del tóner.

Investigaciones realizadas para determinar el daño oxidativo de los solventes orgánicos (algunos de ellos componentes del tóner) sobre la piel humana, han indicado que la exposición *in vitro* (8 horas) a dosis incrementadas de estireno, tolueno, acetona, xileno y percloroetileno, induce peroxidación lipídica y de proteínas, detectada por la cuantificación de los niveles de malondialdehído y de compuestos carbonilos, respectivamente. Además de observar un incremento en la fragmentación del ADN después de la exposición a dichos solventes, evaluada mediante el ensayo Cometa. Lo anterior indica que la exposición a solventes orgánicos induce un daño significativo en las biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) de células humanas. Pero es de resaltar que el efecto más relevante ejercido por los solventes es el que involucra al ADN, molécula es considerada como el blanco primario en la patogénesis del cáncer. De hecho, un proceso carcinogénico también se puede derivar del ataque de un compuesto oxidante (como lo han mostrado ser los solventes orgánicos) que causa fragmentación del genoma nuclear; cumpliendo de este modo el estrés oxidativo un papel importante en el desarrollo de dicho efecto [39].

Otros estudios empleando células meristemáticas de *Vicia faba* para la detección de alteraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátides hermanas (ICH), han indicado que el tóner (compuesto de tolueno, 52%; n-hexano, 25.5%; etanol, 12.5%; etilacetato, 6%; isopropanol, 2.0%; benceno, 1.0%; y n-heptano, 1.0%) aplicado a diferentes concentraciones (0.003, 0.006 y 0.012%) indujo un incremento significativo en la frecuencia de AC's e ICH's. Lo cual indica que *Vicia faba* es un material biológico extremadamente sensible para la detección de daño

en el ADN, y que el tñer es un agente altamente t3xico con potencial mutag3nico debido al daño gen3tico inducido a bajas concentraciones [69, 70].

Entre los componentes del tñer, el benceno es el solvente que m3s ha reportado daño gen3tico, incluyendo AC en animales y humanos; ICH y Mn en sistemas *in vivo* e *in vitro* y quiebres de cadena en el ADN evaluados mediante el ensayo Cometa; as3 como aneuploidias en c3lulas en divisi3n [29, 55, 118, 176, 180, 182, 185]. De hecho, uno de los tantos estudios que evidencian la actividad clastog3nica de este solvente fue el realizado por Anderson *et al.* [6], quien demostr3 que el daño en el ADN de linfocitos humanos inducido por el benceno y cinco de sus metabolitos (con y sin activaci3n metab3lica) puede detectarse a nivel *in vitro* empleando el ensayo Cometa. Es m3s, Randall y colaboradores [143] muestran que, en un sistema cerrado *in vitro* donde la evaporaci3n no es posible, el benceno es un clast3geno activo en ausencia de activaci3n metab3lica ex3gena. De manera similar, otros estudios han evidenciado que el tolueno, principal componente del tñer, induce daño oxidativo en el ADN, lo cual sugiere que este juega un papel importante en la expresi3n de genotoxicidad (AC, Aductos-ADN), carcinogenicidad y toxicidad reproductiva [63, 120, 133]. Seg3n lo anterior, se infiere que ambos solventes tienen un efecto relevante en el daño gen3tico expresado *in vitro* por el tñer (mezcla compleja de solventes), debido a la habilidad individual del benceno y del tolueno para inducir daño en el ADN de c3lulas humanas.

Por otra parte, estudios realizados con otros compuestos del tñer como el etilbenceno, han demostrado actividad mutag3nica en c3lulas de embriones de hamster siriano al incrementarse la frecuencia de micron3cleos [65]. De igual manera, Norppa y Vainio [125] reportan un incremento significativo en la frecuencia de ICH a dosis altamente t3xicas (10 mM) en linfocitos humanos de sangre perif3rica despu3s de la incubaci3n con etilbenceno por 48 horas (en un rango de concentraciones de 0.1 a 10 mM). Lo cual permite inferir que este solvente puede participar activamente en la inducci3n de daño gen3tico de la mezcla compleja tñer. Sin embargo, no se podr3a manejar un concepto definitivo acerca del potencial genot3xico del etilbenceno, debido a que existen estudios contradictorios que lo reportan como un agente no genot3xico, pues no induce AC, ni ICH a nivel *in vitro* [45, 122], lo que posiblemente se debe a las bajas dosis empleadas.

Sumado a lo anterior, existen otros estudios realizados por Chakrabarti y Richer [27], donde se evalúan los efectos genot3xicos y mutag3nicos inducidos por la exposici3n *in vitro* a tolueno y xileno. Dicho estudio demostr3 que los efectos producidos por ambos solventes, tanto de forma individual o en combinaci3n, no fueron ni aditivos, ni sin3rgicos, pues no se increment3 la frecuencia de ICH's en linfocitos humanos. Sin embargo, cuando se hace referencia a una mezcla compleja de solventes, no se trata únicamente de mezclas de tolueno y xileno, sino tambi3n de otros carcin3genos potenciales como el benceno, los cuales en

conjunto después de la exposición *in vitro* pueden interactuar y alterar biomoléculas como el ADN.

No obstante, con lo observado en este estudio respecto al daño genético, se sugiere que los componentes del tiner alteran la estructura del ADN de linfocitos humanos a nivel *in vitro* a las dosis evaluadas. Sin embargo el papel del estrés oxidativo y de procesos alquilantes en los efectos tóxicos del tiner, aun necesita ser clarificado, con la aplicación de pruebas más específicas que permitan evaluar directamente el daño oxidativo y/o alquilante.

La aplicación de una activación metabólica exógena (Fracción S9), no fue necesaria en este estudio, debido a que los resultados permiten inferir que los componentes del tiner presentaron una acción directa sobre la molécula del ADN. Sin embargo, no puede descartarse el efecto de metabolitos originados en el proceso de biotransformación de los componentes del tiner, pues se conoce que los linfocitos presentan una expresión enzimática a nivel *in vitro* [67, 100, 124, 152, 156].

9.2.3 Eficiencia de reparación del daño genético de los linfocitos expuestos al tiner, después de un período de recuperación

El tercer objetivo de este estudio fue el de determinar cuantitativamente si la migración de ADN observada mediante el ensayo Cometa, es el resultado de un daño genético reparable (efecto genotóxico), o por el contrario, es resultado de una fragmentación nuclear apoptótica irreparable (efecto citotóxico) inducida por la exposición *in vitro* al tiner. Autores como Choucroun y colaboradores [30], argumentan que las células con apoptosis temprana no pueden ser detectadas con la aplicación de pruebas de exclusión celular para el análisis citotóxico, y por consiguiente el ensayo Cometa puede no ser un buen indicador de genotoxicidad, pues podrían presentarse falsos positivos. Sin embargo, en este estudio se controló dicho factor de confusión, con el establecimiento de un período de recuperación después del tratamiento, para así descartar el efecto de un daño apoptótico.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian una reducción significativa ($P < 0.001$) en el nivel de daño genético de linfocitos tratados con tiner, después de un período de recuperación de 4 horas. Lo anterior demuestra la eficiencia de reparación de lesiones primarias (quebres de cadena en el ADN y sitios lábiles al álcali) inducidas por el tiner, y la validez del ensayo Cometa como biomarcador de un daño genético reparable. Cabe resaltar que el período de recuperación no mostró un efecto reparador total del daño en el ADN de células tratadas con tiner, posiblemente por el poco tiempo de recuperación dado en este estudio y/o la lenta cinética de reparación del daño en el ADN.

Con respecto al tiempo dado para la reparación del daño genético inducido por el tiner, los resultados de este estudio se relacionan con los obtenidos en otras investigaciones realizadas con otro solvente orgánico, el estireno, utilizando el ensayo Cometa. Dichos estudios han evidenciado que el daño en el ADN inducido por el estireno (durante 1 hora de tratamiento), muestra una reparación eficiente pero no total del daño genético después de 2 a 4 horas de incubación post-tratamiento en medio fresco [12, 99]. Adicionalmente, estudios de reparación realizados por Dypbukt *et al.* [52], han comprobado que después de 24 horas de incubación en medio fresco se presenta una reparación completa del daño en el ADN inducido a altas concentraciones de estireno. Demostrando de este modo, que a un mayor tiempo de recuperación, más eficaz es la reparación del daño en el ADN de células expuestas a solventes orgánicos, como en el caso del estireno. Esto permite inferir que si se hubiese prolongado el tiempo de recuperación, la reparación del daño en el ADN inducido por el tiner, posiblemente hubiese sido mayor e incluso total.

La lentitud en la reparación de quiebres de cadena en el ADN, observada en este estudio como una reparación parcial del daño genético, posiblemente se debe a que los quiebres de cadena también pueden incluir sitios lábiles al álcali (inducidos por aductos y/o ROS), los cuales son reparados lentamente [31], ya que requieren de un mecanismo más complejo de reparación del daño en el ADN (reparación por escisión de bases o de nucleótidos). Además, de especularse que los sitios AP lábiles al álcali son sucesivamente convertidos a quiebres de cadena simple durante el tiempo de incubación [31, 99, 171], contribuyendo a la relativa lentitud de la cinética de unión de quiebres de cadena y por consiguiente a la no reparación total del daño en el ADN, a tan corto tiempo.

Es importante hacer referencia a los resultados obtenidos en la reparación del daño genético a dosis alta de tiner, pues, fue la que presentó un marcado efecto en la reparación del daño durante el período de recuperación. Este efecto posiblemente este asociado con una mayor estimulación de los mecanismos de reparación de ADN celular, como estrategia de defensa frente al ataque oxidativo inducido *in vitro* por los componentes del tiner a altas dosis.

Con relación al efecto de reparación observado para todos los tratamientos en general, incluyendo el control positivo, se logró apreciar que el H₂O₂ además de inducir alto daño genético, también fue el tratamiento que mejor respondió durante el período de recuperación, con una mayor expresión de la reparación del daño en el ADN. Esto presumiblemente se debe a que el H₂O₂ por ser un químico individual, presenta un mecanismo de daño genético más “agresivo” y una reparación del ADN específicos, pues ya es bien conocido que el H₂O₂ induce daño genético directamente por estrés oxidativo, con la generación de radicales OH, que son altamente reactivos con el ADN [25, 33, 178]. A diferencia del tiner, el cual por ser una mezcla compleja de solventes, presenta diferentes mecanismos moleculares de daño genético (posiblemente por alquilación y/o oxidación del

ADN) y por consiguiente diferentes y complejas vías de reparación, que en cierto modo reducen el tiempo o cinética de reparación de las lesiones en el ADN.

Por otro lado, varios estudios han mostrado la influencia de los polimorfismos genéticos de enzimas involucradas en la biotransformación de xenobioticos y en la reparación del daño al ADN, sobre el efecto genético inducido por ciertos agentes a nivel *in vitro* [67, 100, 124, 152, 156]. Por esta razón, es importante tener en cuenta las características genotípicas del donante, ya que éstas pueden determinar en cierto modo la susceptibilidad individual asociada con la exposición al tñner. Mediante el estudio previo de la variabilidad individual determinada por los polimorfismos, utilizando las técnicas de PCR Multiplex y PCR/RFLPs, el donante de los linfocitos evaluados en este estudio, resultó ser positivo para GSTT1 y nulo para GSTM1; homocigoto silvestre para CYP2E1, XRCC1 (Codones 280 y 194) y XRCC3 (codon 241); y heterocigoto para XRCC1 (codon 399), lo que permite inferir que dicho individuo presenta una efectiva activación metabólica y detoxificante de xenobioticos, así como una activa y eficaz reparación de lesiones en el ADN inducida por la exposición al tñner. Sin embargo, este tipo de conclusión no logra ser considerada como definitiva, pues dichos análisis son de carácter poblacional, en los cuales se incluye una mayor variabilidad de genotipos y por lo tanto diferentes tipos de susceptibilidad individual a químicos, como en este caso al tñner.

Los resultados de este estudio muestran que el tñner induce daño genético de forma dosis-dependiente en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones. Además se demuestra que las lesiones producidas por el tñner son removidas eficientemente durante unas pocas horas, después de aplicar el tratamiento. La asociación entre el daño genético y la eficiencia de reparación de dicho daño evaluada mediante el ensayo Cometa, permite determinar que las lesiones primarias generadas por la exposición *in vitro* al tñner, son el resultado de un efecto genotóxico y no el resultado de una fragmentación nuclear apoptótica (efecto citotóxico).

La identificación de agentes mutagénicos es determinante para la prevención de enfermedades como el cáncer. Estudios epidemiológicos han identificado claramente una asociación entre la exposición a mezclas complejas y la incrementada incidencia de cáncer a nivel ocupacional. Según estudios realizados por la IARC en 1989 [86], existe "suficiente evidencia" de carcinogenicidad en pintores; los cuales están expuestos a una multitud de carcinógenos, entre los que se destacan los solventes orgánicos [106]. El tñner es la mezcla compleja de solventes más común y frecuentemente empleada entre los pintores. Por consiguiente, los resultados obtenidos en este estudio respecto al efecto directo de los componentes del tñner y/o sus metabolitos sobre el ADN de linfocitos humanos, alertan sobre el posible daño genético que pueden estar experimentando sujetos expuestos ocupacionalmente de manera continua y constante a este tipo de mezcla de solventes. Luego, si los daños (lesiones

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

primarias) producidos en el ADN por los solventes orgánicos (tíner) no logran ser reparados o son reparados incorrectamente, después de haber transcurrido una división celular, dichos daños son fijados y expresados como mutaciones, que pueden causar graves problemas de salud como el cáncer.

Finalmente, la aplicación del ensayo Cometa alcalino y la implementación de una prueba complementaria como el período de recuperación, que permite evidenciar la reparación del daño genético, se constituyen en un gran aporte en la búsqueda hacia la validación de este ensayo. Puesto que la aplicación de ambas pruebas, fortalecen la confiabilidad de los datos obtenidos e identifican al ensayo Cometa como un eficiente biomarcador para evaluar el efecto genotóxico de mutágenos a nivel *in vitro*, sin descartar su valiosa utilidad en estudios *in vivo* y de biomonitorio en poblaciones humanas.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

10. CONCLUSIONES

Esta investigación hace parte de los pocos estudios reportados para la evaluación del tñner como mezcla compleja de solventes, con la aplicación de una prueba genotóxica en cultivos de células humanas normales, empleando el ensayo Cometa. Esta metodología se caracterizó por ser una prueba técnicamente simple, rápida, de bajo costo y muy sensible para la detección del daño en el ADN de linfocitos aislados de sangre periférica expuestos *in vitro* al tñner.

Los resultados de este estudio relacionan fuertemente a los componentes del tñner como los agentes inductores de daño citotóxico (reducción en la viabilidad celular) y de lesiones primarias en el ADN (quiebres de cadena y sitios AP lábiles al álcali) de linfocitos humanos expuestos *in vitro* a diferentes dosis, mostrando una relación dosis-dependiente. La reducción en la viabilidad celular posiblemente esta relacionada con la habilidad común de los componentes individuales del tñner para interactuar con las membranas biológicas, induciendo la ruptura de la membrana y cambios en la función de proteínas integrales de la misma. Mientras que el efecto genético probablemente esta asociado con procesos de estrés oxidativo o alquilación del ADN. El efecto reparador de las lesiones en el ADN producidas por el tñner, durante un período de recuperación líquida, permitió demostrar la eficiencia de reparación del daño en el ADN de linfocitos, y la sensibilidad del ensayo Cometa alcalino como biomarcador para detectar bajos niveles de daño genético.

La generación de daño en el ADN se considera como un importante evento inicial en la carcinogénesis. Por esta razón se hace necesario realizar más estudios sobre el efecto genotóxico de mezclas complejas, pues al evidenciarse en este estudio, el efecto directo de los componentes del tñner sobre el ADN, se infiere una alta probabilidad de riesgo por exposición ocupacional al tñner, sino se conservan las mínimas medidas de protección personal. Este estudio no busca acabar con el uso que se le da al tñner en diversos campos de la industria o a nivel domestico, sino por el contrario, busca alertar sobre el posible daño genético que pueden estar experimentando sujetos expuestos ocupacionalmente de manera continua y constante a este tipo de mezcla de solventes; además de servir como una medida de control y de prevención del riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

11. IMPACTO

Al ser divulgados los resultados de este estudio en artículos científicos, ponencias en eventos nacionales e internacionales, y por medio de cursos dirigidos a la población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos, se busca concientizar sobre el posible daño genético que pueden estar experimentando individuos que se encuentran frecuentemente expuestos al tiner, además de motivar sobre la autorreflexión y diseño de estrategias de prevención y control del riesgo de desarrollar problemas de salud (cáncer), mediante la implementación de las mínimas medidas de protección personal y de bioseguridad en el lugar de trabajo.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

12. RECOMENDACIONES

La evaluación de la genotoxicidad de agentes químicos relevantes como los solventes orgánicos, requiere del diseño de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que parece claro que ningún único ensayo es capaz de detectar todos los posibles agentes genotóxicos (mutagénicos, carcinogénicos).

Seria muy conveniente evaluar el efecto genotóxico del tiner en linfocitos humanos de sangre periférica y en células del tracto respiratorio, combinando el ensayo Cometa alcalino con la enzima endonucleasa III o con la formamidopirimidin ADN glicosilasa (Fpg) para detectar pirimidinas oxidadas.

Para futuros estudios, es necesario evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad *in vitro* del tiner con activación metabólica (facción microsomal S9) para expresar el efecto de los metabolitos de los componentes del tiner. Sin embargo, se debe tener cuidado con el uso de la activación metabólica, debido a que en un estudio realizado por Anderson *et al.* [7], se observó que cuando se usa el dimetil sulfóxido como vehículo, hay un incremento en el número de Cometas apoptóticos. No obstante, la presencia de dichos Cometas apoptóticos pueden discriminarse fácilmente por su morfología, y no ser incluirlos en el análisis.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

BIBLIOGRAFÍA

1. AKSOY, H., YILMAZ, S., CELIK, M., YUZBASIOGLU, D. and UNAL, F. Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. En : J. Appl. Toxicol. Vol. 26, (2006); P 10-15.
2. ALGUACIL, J., PORTA, M., MALATS, N., KAUPPINEN, T., KOGEVINAS, M., BENAVIDES, F. G., PARTANEN, T. and CARRATO, A. Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. En : Carcinogenesis. Vol. 23, (2002); P. 101-106.
3. ANDERSON, D., YU, T. W. and BROWNE, M. A. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridization (FISH) assays. En : J. Urol. Vol. 390, (1997); P. 69-77.
4. ANDERSON, D., YU, T. W. and MCGREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. En : Mutagenesis. Vol. 13, (1998); P. 539-555.
5. ANDERSON, D., YU, T. W., PHILLIPS, B. J. and SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. En : J. Urol. Vol. 307, (1994); P. 261-271.
6. ANDERSON, D., YU, T. W. and SCHMEZER, P. An investigation of the DNA-damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 26, (1995); P. 305-314.
7. ANDERSSON, M., AGURELL, E., VAGHEF, H., BOLCSFOLDI, G. and HELLMAN, B. Extended-term cultures of human T-lymphocytes and the comet assay: a useful combination when testing for genotoxicity *in vitro*? En : J. Urol. Vol. 540, (2003); P. 43-55.
8. ANGELIS, K. J., DUSINSKA, M. and COLLINS, A. R. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. En : Electrophoresis. Vol. 20, (1999); P. 2133-2138.
9. AVISHAI, N., RABINOWITZ, C. and RINKEVICH, B. Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity: comparisons between visual and image analyses. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 42, (2003); P. 155-165.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

10. BAELUM, J. Human solvents exposure. En : Pharmacol. Toxicol. Vol. 1, (1991); P. 1-36.
11. BAKAND, S., WINDER, C., KHALIL, C. and HAYES, A. A novel *in vitro* exposure technique for toxicity testing of selected, volatile organic compounds. En : Journal of Environmental Monitoring. Vol. 8, (2006); P. 100-105.
12. BASTLOVA, T., VODICKA, P., PETERKOVA, K., HEMMINKI, K. and Lambert, B. Styrene oxide-induced HPRT mutations, DNA adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes. En : Carcinogenesis. Vol. 16, (1995); P. 2357-2362.
13. BAYDAS, G., REITER, R. J. and NEDZVETSKII, V. S. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. En : Toxicol. Lett. Vol. 137, (2003); P. 169-174.
14. BELPAEME, K., COOREMAN, K. and KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. En : J. Urol. Vol. 415, (1998); P. 167-184.
15. BENDER, M., GRIGGS, H. and WALKER, P. Mechanisms of chromosomal aberrations production I. Aberration induction by ultraviolet light. En : J. Urol. Vol. 20, (1973); P. 387-402.
16. BLAAUBOER, B. J. The applicability of *in vitro*-derived data in hazard identification and characterization of chemicals. En : Environmental toxicology and Pharmacology. Vol. 11, (2002); P. 213-225.
17. BLAIR, A., HARTGE, P., STEWART, P. A., MCADAMS, M. and LUBIN, J. Mortality and cancer incidence of aircraft maintenance workers exposed to trichloroethylene and other organic solvents and chemicals: extended follow up. En : Occup. Environ. Med. Vol. 55, (1998); P. 161-171.
18. BOCKER, W., BAUCH, T., MULLER, W. U. and STREFFER, C. Image analysis of comet assay measurements. En : Int. J. Radiat. Biol. Vol. 72, (1997); P. 449-460.
19. BONASSI, S. Combining environmental exposure and genetic effect measurements in health outcome assessment. En : J. Urol. Vol. 428, (1999); P. 177-185.
20. BRAUTBAR, N. and WILLIAMS, J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. En : Int. J. Hyg. Environ. Health. Vol. 205, (2002); P. 479-491.

21. BRENDLER-SCHWAAB, S., HARTMANN, A., PFUHLER, S. and SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. En : Mutagenesis. Vol. 20, (2005); P. 245-254.
22. BURMISTROV, S. O., ARUTYUNYAN, A. V., STEPANOV, M. G., OPARINA, T. I. and PROKOPENKO, V. M. Effect of chronic inhalation of toluene and dioxane on activity of free radical processes in rat ovaries and brain. En : Bull. Exp. Biol. Med. Vol. 132, (2001); P. 832-836.
23. BUSHNELL, P. J., BOYES, W. K. and SHAFER, T. J. Developing an exposure-dose-response model for the acute neurotoxicity of organic solvents: overview and progress on *in vitro* models and dosimetry. En : Environmental toxicology and Pharmacology. Vol. 19, (2005); P. 607-614.
24. CADET, J., DOUKI, T., GASPARUTTO, D. and RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. En : J. Urol. Vol. 531, (2003); P. 5-23.
25. CANTONI, O. and GIACOMONI, P. The role of DNA damage in the cytotoxic response to hydrogen peroxide/histidine. En : Gen. Pharmacol. Vol. 29, (1997); P. 513-516.
26. CARABEZ, A., SANDOVAL, F. and PALMA, L. Ultrastructural changes of tissues produced by inhalation of thinner in rats. En : Microsc. Res. Tech. Vol. 40, (1998); P. 56-62.
27. CHAKRABARTI, S. and RICHER, C. Cytogenetic evaluation of genotoxicity caused by mixed exposures to toluene and xylene. En : Proceedings Vol. 34, (1991); P. 159.
28. CHAPMAN, D. E., NAMKUNG, M. J. and JUCHAU, M. R. Benzene and benzene metabolites as embryotoxic agents: effects on cultured rat embryos. En : Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 128, (1994); P. 129-137.
29. CHEN, H., RUPA, D. S., TOMAR, R. and EASMOND, D. Chromosomal loss and breakage in mouse bone marrow and spleen cells exposed to benzene *in vivo*. En : Cancer Res. Vol. 54, (1994); P. 3533-3539.
30. CHOUCROUN, P., GILLET, D., DORANGE, G., SAWICKI, B. and DEWITTE, J. D. Comet assay and early apoptosis. En : J. Urol. Vol. 478, (2001); P. 89-96.
31. CHOVANEC, M., NASLUND, M., SPIVAK, I., DUSINSKA, M., CEDERVALL, B. and Kolman, A. Rejoining of DNA strand breaks induced by propylene oxide and epichlorohydrin in human diploid fibroblasts. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 32, (1998); P. 223-228.

32. COK, I., SARDAS, S., KADIOGLU, E. and OZCAGLI, E. Assessment of DNA damage in glue sniffers by use of the alkaline comet assay. En : J. Urol. Vol. 557, (2004); P. 131-136.
33. COLLINS, A., AI-GUO, M. and DUTHIE, S. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. En : J. Urol. Vol. 336, (1995); P. 69-77.
34. COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. En : Mol. Biotechnol. Vol. 26, (2004); P. 249-261.
35. COLLINS, A. R., DUSINSKA, M., HORVATHOVA, E., MUNRO, E., SAVIO, M. and STETINA, R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay. En: Mutagenesis. Vol. 16, (2001); P. 297-301.
36. CONDE-SALAZAR, L., GONZALEZ, M. A., GUIMARAENS, D. and ROMERO, L. Occupational allergic contact dermatitis from styrene. En : Contact Dermatitis. Vol. 21, (1989); P. 112.
37. COOK, P. R. and BRAZELL, I. A. Supercoils in human DNA. En : J. Cell Sci. Vol. 19, (1975); P. 261-279.
38. CORNETTA, T., FESTA, F., TESTA, A. and COZZI, R. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. En : int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. Vol. 66, (2006); P. 537-545.
39. COSTA, C., PASQUALE, R. D., SILVARI, V., BARBARO, M. and CATANIA, S. *In vitro* evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. En : Toxicol. *In vitro*. Vol. 20, (2006); P. 324-331.
40. COTELLE, S. and FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 34, (1999); P. 246-255.
41. CROUTE, F., POINSOT, J. and GAUBIN, Y. Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. En : Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1591, (2002); P. 147-155.
42. CUTLER, R. and RODRIGUEZ, H. Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention. Singapore, (2003). World Scientific Publishing Co. Pte .Ltd.

43. DAVILA, J. C., RODRIGUEZ, R. J., MELCHERT, R. B. and ACOSTA, D. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. En : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Vol. 38, (1998); P. 63-96.
44. DE-BOECK, M., TOUIL, N., DE, V. G., VANDE, P. A. and KIRSCH-VOLDERS, M. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. En : J. Urol. Vol. 469, (2000); P. 181-197.
45. DEAN, B. J., BROOKS, T. M., HODSON-WALKER, G. and HUTSON, D. H. Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. En : J. Urol. Vol. 153, (1985); P. 57-77.
46. DILLIOGLUGIL, M. O., ILGAZLI, A., MARAL, H., SENGUL, C., OZDEMIR, G. and ERCIN, C. Protective effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. En : Respiriology. Vol. 10, (2005); P. 615-619.
47. DREIEM, A., MYHRE, O. and FONNUM, F. Involvement of the extracellular signal regulated kinase pathway in hydrocarbon-induced reactive oxygen species formation in human neutrophil granulocytes. En : Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 190, (2003); P. 102-110.
48. DUEZ, P.; DEHON, G.; KUMPS, A. and DUBOIS, J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. En : Mutagenesis. Vol. 182, (2003); P. 159-166.
49. DUNDARUZ, M., TURKABAY, T. and AKAY, C. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. En : Turk. Journal of Pediatrics. Vol. 45, (2003); P. 43-45.
50. DUSINSKA, M. and COLLINS, A. R. Detection of oxidized purines and UV induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion specific enzymes in the comet assay. En : Alternatives to Laboratory Animals. Vol. 24, (1996); P. 405-411.
51. DUTHIE, S. The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measure using alkaline single cell gel electrophoresis En: Cutler, R. and Rodriguez, H. Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention. Singapore, (2003). World scientific publishing Co. pte Ltd. P. 300-320.
52. DYPBUKT, J. M., COSTA, L. G., MANZO, L., ORRENIUS, S. and NICOTERA, P. Cytotoxic and genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in neuroadrenergic Pc 12 cells. En : Carcinogenesis. Vol. 13, (1992); P. 417-424.

53. EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B. and BAKER, V. Methods of *in vitro* toxicology. En : Food Chem. Toxicol. Vol. 40, (2002); P. 193-236.
54. ENGELKE, M., TAEHTI, H. and VAALAVIRTA, L. Perturbation of artificial and biological membranes by organic compounds of aliphatic, alicyclic and aromatic structure. En : Toxicology *In vitro*. Vol. 10, (1996); P. 111-115.
55. EREXSON, G. L., WILMER, T. D. and KLIGERMAN, A. D. Sister chromatid exchange induction of human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites *in vitro*. En : Cancer Res. Vol. 45, (1985); P. 2471-2477.
56. ESPINOSA, J. El blanco del thinner es el organismo entero. [on line] Ciencia. (1999). Disponible en versión HTML en: <<http://www.uaq.mx/fcps/tribuna/336/cie01.htm>>
57. FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L. and O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. En : J. Urol. Vol. 339, (1995); P. 37-59.
58. FAUST, F., KASSIE, F., KNASMULLER, S., BOEDECKER, R. H., MANN, M. and MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. En : J. Urol. Vol. 566, (2004); P. 209-229.
59. FAUST, F., KASSIE, F., KNASMULLER, S., KEVEKORDES, S. and MERSCH-SUNDERMANN, V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. En : Toxicology. Vol. 198, (2004); P. 341-350.
60. FENECH, M., CROTT, J., TURNER, J. and BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytoskeleton and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. En : Mutagenesis. Vol. 14, (1999); P. 605-612.
61. FESUS, L., DAVIES, P. J. and PIACENTINI, M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. En : Eur. J. Cell Biol. Vol. 56, (1991); P. 170-177.
62. FRENZILLI, G., BOSCO, E. and BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. En : J. Urol. Vol. 468, (2000); P. 93-108.
63. GAIKWAD, N. W. and BODELL, W. J. Formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with the toluene metabolite p-cresol: a potential biomarker for toluene exposure. En : Chem. Biol. Interact. Vol. 145, (2003); P. 149-158.

64. GERNER-SMIDT, P. and FRIEDRICH, U. The mutagenic effect of benzene, toluene and xylene studied by the SCE technique. En : J. Urol. Vol. 58, (1978); P. 313-316.
65. GIBSON, D. P., BRAUNINGER, R. and SHAFFI, H. S. Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. En : J. Urol. Vol. 392, (1997); P. 61-70.
66. GILLE, G. and SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. En : Folia Microbiol. Vol. 40, No. 1, (1995); P. 31-152.
67. GODDERIS, L., AKA, P., MATEUCA, R., KIRSCH-VOLDERS, M., LISON, D. and VEULEMANS, H. Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. En : Toxicology. Vol. 219, (2006); P. 220-229.
68. GOLD, L. and AMES, B. Too many rodent carcinogens? (1990); P. 970-971.
69. GOMEZ, S. Efectos cromosómicos del tiner y algunos de sus principales componentes en *Vicia faba*. México, 1980. Tesis (Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.
70. GOMEZ, S. and CASTILLO, P. Sister chromatid exchanges induced by thinner in *Vicia faba*. En : Contaminacion Ambiental. Vol. 1, (1985); P. 17-23.
71. GUO, J. Y. and TU, Z. H. Comet electrophoresis of blood nucleated cells in genotoxicity assessment. En : Zhongguo Yao Li Xue. Bao. Vol. 20, (1999); P. 975-978.
72. HALIFEOGLU, I., CANATAN, H., USTUNDAG, B., ILHAN, N. and INANC, F. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. En : Cell Biochem. Funct. Vol. 18, (2000); P. 263-267.
73. HARTMANN, A., ELHAJOUJI, A. and KISKINIS, E. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. En : Food Chem. Toxicol. Vol. 39, (2001); P. 843-858.
74. HEBDERSON, R. F. The effect of dose, dose rate, route of administration and species on tissues and blood levels of benzene metabolites. En : Environ. Health Perspect. Vol. 82, (1989); P. 9-17.

75. HELLMAN, B., VAGHEF, H. and BOSTROM, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. En : J. Urol. Vol. 336, (1995); P. 123-131.
76. HENDERSON, L., WOLFREYS, A., FEDYK, J., BOURNER, C. and WINDEBANK, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. En : Mutagenesis. Vol. 13, (1998); P. 89-94.
77. HETTS, S. W. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. En : JAMA. Vol. 279, (1998); P. 300-307.
78. HOYOS, L. S. Susceptibilidad genética y efectos genotóxicos por exposición ocupacional a solventes orgánicos. Medellín, 2003. Trabajo de grado (Magíster en Salud ocupacional). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Área genética.
79. HOYOS, L. S. and Carvajal, S. Manual de citogenética: Linfocitos Humanos. Grupo de investigación en toxicología genética y citogenética. Popayán, Universidad del Cauca. (2002); P. 1-58.
80. ILGAZLI, A., SENGUL, C., MARAL, H., OZDEN, M. and ERCIN, C. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. En : Clin. Chim. Acta. Vol. 343, (2004); P. 141-144.
81. IMLAY, J. and LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. En : Science. Vol. 240, (1988); P. 1302-1309.
82. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA DE COLOMBIA INC. [on line] Comunicado de Prensa Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. (2007). Disponible en Internet. <http://www.incancerologia.gov.co/paginas.aspx?cat_id=-1&pub_id=327>
83. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC. Benzene. Lyon, France. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. No. 1, (1987); P. 120-122.
84. _____ Wood, leather and some associated industries. Lyon, France. IARC Monographies evaluation of carcinogen risks humans. No. 25. (1981).
85. _____ Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. Lyon, France. IARC Monographies evaluation of carcinogens risk humans. No. 63. (1995).
86. _____ Some organic solvents, Resin monomers and Related compounds, Pigments and Occupational Exposures in paint manufacture

and Painting. IARC. IARC Monographies of evaluation carcinogenesis of risks on human. No. 47. (1989).

87. INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY IPCS. Environmental Health Criteria. Xylenes. Geneve, World Health Organization. Environmental Health Criteria. No. 190, (1997); P. 1-147.
88. _____ Environmental Health Criteria. Ethylbenzene. Genova, World Health Organization. Environmental Health Criteria. No. 186, (1996); P. 1-101.
89. _____ Environmental Health Criteria. White Spirit. Genova. Environmental Health Criteria. No. 187, (1996); P. 46-49.
90. IRAVATHY, K., SHANKARAPPPA, K., VIJAYASHREE, B., PRABHAKAR, K. and AHUJA, Y. DNA Damage and Repair Studies in Individuals Working with Photocopying Machines. En : International Journal of Human Genetics. Vol. 1, (2001); P. 139-143.
91. JAGANNATH, D., MATHESON D, and BRUSICK D. Mutagenicity evaluation of toluene. Kensington, (1978). Maryland: Litton Bionetics Inc.
92. KASSIE, F., PARZEFALL, W. and KNASMULLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. En : J. Urol. Vol. 463, (2000); P. 13-31.
93. KAUPPINEN, T., PARTANEN, T., DEGERTH, R. and OJAJARVI, A. Pancreatic cancer and occupational exposures. En : Epidemiology Vol. 6, (1995); P. 498-502.
94. KELVEY-MARTIN, V. J., GREEN, M. H., SCHMEZER, P., POOL-ZOBEL, B. L., DE MEO, M. P. and COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. En : J. Urol. 288, (1993); P. 47-63.
95. KISKINIS, E., SUTER, W. and HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. En : Mutagenesis. Vol. 17, (2002); P. 37-43.
96. KIZILIAN, N., WILKINS, R., REINHARDT, P., FERRAROTTO, C., McLEAN, J. and McNAMEE, J. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. En : Biotechniques. Vol. 27, (1999); P. 926-930.
97. KOMIYAMA, M. and YAMANAKA, K. Chronic misuse of paint thinners. En : J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. Vol. 67, (1999); p. 247.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

98. KONCA, K., LANKOFF, A. and BANASIK, A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. En : J. Urol. Vol. 534, (2003); P. 15-20.
99. LAFFON, B., PÁSARO, E. and MENDEZ, J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the comet assay. En : Toxicol. Lett. Vol. 126, (2002); P. 61-68.
100. LAFFON, B., PEREZ, B. and MENDEZ, J. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. En : Alcalíber de la Real Academia Nacional de Farmacia. Vol. 70, (2004); P. 95-123.
101. LEE, E., OH, E., LEE, J., SUL, D. and LEE, J. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. En : Toxicol. Sci. Vol. 81, (2004); P. 121-132.
102. LEE, R. and STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. En : J. Urol. Vol. 544, (2003); P. 43-64.
103. LLANOS, G. Vigilancia ocupacional de la exposición a sustancias potencialmente cancerígenas. Viane y Motavita. Seguro Social. Protección laboral. Administradora de riesgos profesionales. (2002). P. 1-88.
104. LOVELL, D. P., THOMAS, G. and DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. En : Teratog. Carcinog. Mutagen. Vol. 19, (1999); P. 109-119.
105. LUNDBERG, I. and MILATOU-SMITH, R. Mortality and cancer incidence among Swedish paint industry workers with long-term exposure to organic solvents. En : Scand. J. Work Environ. Health. Vol. 24, (1998); P. 270-275.
106. LYNGE, E., ANTTILA, A. and HEMMINKI, K. Organic solvents and cancer. En : Cancer Causes Control. Vol. 8, (1997); P. 406-419.
107. MAJESKA, J. and HOLDEN, H. Genotoxic effects of p-aminophenol in Chinese hamster ovary and mouse lymphoma cells: results of a multiple endpoint test. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 26, (1995); P. 163-170.
108. MALTONI, C., CILIBERTI, A., PINTO, C., SOFFRITTI, M., BELPOGGI, F. and MENARINI, L. Results of long-term experimental carcinogenicity studies of the effects of gasoline, correlated fuels, and major gasoline aromatics on rats. En : Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 837, (1997); P. 15-52.

109. MARINI, M., MUSIANI, D., SESTILI, P. and CANTONI, O. Apoptosis of human lymphocytes in the absence or presence of internucleosomal DNA cleavage. En : Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 229, (1996); P. 910-915.
110. MARTINEZ, M., PALMA, L., SANDOVAL, F. and CARABEZ, A. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. En : Toxicol. Lett. Vol. 163, (2006); P. 198-205.
111. MATOS, E. Riesgo de cáncer en exposiciones ocupacionales. [on line] Revista Gerencia Ambiental. No. 33. (1997). Disponible en Internet. <<http://es.geocities.com/ecored2000/ocupacional.html>>
112. McDERMOTT, C., ALLSHIRE, A., Van PELT, F. and HEFFRON, J. Validation of a method for acute and subchronic exposure of cells *in vitro* to volatile organic solvents. En : Toxicol. *In vitro*. Vol. 21, (2007); P. 116-124.
113. McMICHAEL, A. Carcinogenicity of benzene, toluene and xylene: epidemiological and experimental evidence. En : IARC Sci. Publ. (1988); 3-18.
114. MEDINA, M., CRAVIOTO, P., VILLATORO, J., FLEIZ, C., GALVAN, F. and CONYER, R. Consumo de drogas entre adolescentes resultados de la Encuesta Nacional de Adicciones 1998. En : Salud Pública de México. Vol. 45, (2003); P. 16-25.
115. MOHTASHAMIPUR, E., NORPOTH, K., WOELKE, U. and HUBER, P. Effects of ethylbenzene, toluene, and xylene on the induction of micronuclei in bone marrow polychromatic erythrocytes of mice. En : Arch. Toxicol. Vol. 58, (1985); P. 106-109.
116. MOLLER, P., KNUDSEN, L., LOFT, S. and WALLIN, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. En : Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Vol. 9, (2000); P. 1005-1015.
117. MONTEITH, D. and VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. En : J. Urol. 345, (1995); P. 97-103.
118. MORETTI, M., VILLARINI, M. and SIMONUCCI, S. Effects of co-exposure to extremely low frequency (ELF) magnetic fields and benzene or benzene metabolites determined *in vitro* by the alkaline comet assay. En : Toxicol. Lett. Vol. 157, (2005); P. 119-128.

119. MULLER, W., BAUCH, T., STREFFER, C., NIEDEREICHHOLZ, F. and BOCKER, W. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. En : Int. J. Radiat. Biol. Vol. 65, (1994); P. 315-319.
120. MURATA, M., TSUJIKAWA, M. and KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. En : Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 261, (1999); P. 478-483.
121. NARAYANAN, S., O'DONOVAN, M. R. and DUTHIE, S. J. Lysis of whole blood *in vitro* causes DNA strand breaks in human lymphocytes. En : Mutagenesis. Vol. 16, (2001); P. 455-459.
122. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM NTP. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylbenzene (CAS No. 100-41-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). National Toxicology Program Technical Report Series. No. 466, (1999); P. 1-231.
123. NIÑO, R and CAMARGO, J. Caracterización del thinner para la industria de pinturas de uso domestico en Santa Fe de Bogotá D.C. por cromatografía de gases. Bogotá, 1999. Trabajo de grado (Químico farmacéutico). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de farmacia.
124. NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. En : Toxicol. Lett. Vol. 149, (2004); P. 309-334.
125. NORPPA, H. and VAINIO, H. Induction of sister-chromatid exchanges by styrene analogues in cultured human lymphocytes. En : J. Urol. Vol. 116, (1983); P. 379-387.
126. NURMINEN, M. and KARJALAINEN, A. Epidemiologic estimate of the proportion of fatalities related to occupational factors in Finland. En : Scand. J. Work Environ. Health. Vol. 27, (2001); P. 161-213.
127. OLIVE, P., BANATH, J. and DURAND, R. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. En : Radiat. Res. Vol. 122, (1990); P. 86-94.
128. OLIVE, P. and DURAND, R. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. En : Cytometry. Vol. 66, (2005); P. 1-8.
129. OLIVE, P., WLODEK, D., Durand, R., and Banath, J. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. En Exp. Cell Res. Vol. 198, (1992); P. 259-267.

130. OLSSON, H. and BRANDT, L. Occupational exposure to organic solvents and Hodgkin's disease in men. A case-referent study. En : Scand. J. Work Environ. Health. Vol. 6, (1980); P. 302-305.
131. OSTLING, O. and JOHANSON, K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. En : Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 123, (1984); P. 291-298.
132. PANDRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S. and VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 26, (1995); P. 345-356.
133. PELCLOVA, D., CERNA, M. and PASTORKOVA, A. Study of the genotoxicity of toluene. En : Arch. Environ. Health. Vol. 55. No. 4, (2000); P. 268-273.
134. PEÑA, G, VARONA, M, ACOSTA, H, CARDENAS, O, SANCHEZ, C, CARDOZO, M, and NUÑEZ, S. Evaluación epidemiológica de la exposición a solventes orgánicos en fábricas de pinturas y pegantes en Santa Fe de Bogotá. Bogotá, Imprenta del Instituto Nacional de Salud. Documento técnico. (1996). P. 1-28.
135. PINTO, D., CEBALLOS, J. and GARCIA, G. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. En : J. Urol. Vol. 467, (2000); P. 105-111.
136. PITARQUE, M., VAGLENOV, A. and NOSKO, M. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. En : J. Urol. Vol. 441, (1999); P. 115-127.
137. _____ Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. En : Environ. Health Perspect. Vol. 110. No. 4, (2002); P. 399-404.
138. PLAPPERT, U., BARTHEL, E. and SEIDEL, H. Reduction of benzene toxicity by toluene. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 24, (1994); P. 283-292.
139. PLEWA, M., KARGALIOGLU, Y., VANKERK, D., MINEAR, R. and WAGNER, E. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. En : Environ. Mol. Mutagen. vol. 40, (2002); P. 134-142.
140. PLEWA, M., WAGNER, E. and Jazwierka, P. Halonitromethane Drinking Water Disinfection Byproducts: Chemical Characterization and Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity. En : Environmen. Scien. Technolo. Vol. 38, (2004); P. 62-68.

141. PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. RIPQPT Registro Internacional de Productos Químicos Potencialmente Tóxicos. Editorial boletín. No. 8, (1987); P. 1-2.
142. QUINTANA, P., DE, P., KLATZKE, S. and PARK, H. Gossypol-induced DNA breaks in rat lymphocytes are secondary to cytotoxicity. En : Toxicol. Lett. Vol. 117, (2000); P. 85-94.
143. RANDALL, V., MACKAY, J., OWERS, M., ASHBY, J. and ELLIOT, B. *In vitro* clastogenicity of benzene: A problem of metabolism and volatility. En : Mutagenesis. Vol. 8, (1993); P. 846-848.
144. REGO, M. A., SOUSA, C. S., KATO, M., DE CARVALHO, A. B., LOOMIS, D. and CARVALHO, F. M. Non-Hodgkin's lymphomas and organic solvents. En : J. Occup. Environ. Med. Vol. 44, (2002); P. 874-881.
145. RICHER, C., CHAKRABARTI, S., SENECA-QUEVILLON, M., DUHR, M. A., ZHANG, X. and TARDIF, R. Cytogenetic effects of low-level exposure to toluene, xylene, and their mixture on human blood lymphocytes. En : Int. Arch. Occup. Environ. Health. Vol. 64, (1993); P. 581-585.
146. RINSKY, R., SMITH, A. and HORNUNG, R. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. En : N. Engl. J. Med. Vol. 316, (1987); P. 1044-1050.
147. ROBERTS, R. and ALDOUS, E. Recovery from ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. En : J. Bacteriol. Vol. 57, (1949); P. 363-375.
148. RODRIGUEZ ARNAIZ, R. and VILLALOBOS-PIETRINI, R. Genetic effects of thinner, benzene and toluene in *Drosophila melanogaster*. 2. Sex linked recessive lethal mutations and translocations II-III. En : Contaminacion Ambiental. Vol. 1, (1985); P. 45-49.
149. ROJAS, E., LOPEZ, M. C. and VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. En : J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. Vol. 722, (1999); P. 225-254.
150. RUNDELL, M., WAGNER, E. and PLEWA, M. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 42, (2003); P. 61-67.
151. RYDBERG, B. and JOHANSON, K. J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. New York: Academic Press, (1978); P. 465-468.
152. SCHLADE-BARTUSIAK, K., SASIADEK, M. and KOZLOWSKA, J. The influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on the induction of sister

- chromatid exchanges and chromosome aberrations by 1,2:3,4-diepoxybutane. En : J. Urol. Vol. 465, (2000); P. 69-75.
153. SCHMEZER, P., RAJAEI-BEHBAHANI, N. and RISCH, A. Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. En : Mutagenesis. Vol. 16, (2001); P. 25-30.
 154. SIEMIATYCKI, J. Risk factors for cancer in the workplace. Boca ratón, Florida USA: CRC Press, (2007); P. 1-325.
 155. SIKKEMA, J., DEBONT, J. and POOLMAN, B. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. En : The Journal of Biological Chemistry. Vol. 29, (1994); P. 8022-8028.
 156. SILVA, M., GASPAR, J., DUARTE, S., FABER, A. and RUEFF, J. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes and the genotoxicity of hydroquinone in human lymphocytes. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 43, (2004); P. 258-264.
 157. SINGH, N. P. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: Principles and Methodology In: PFEIFER, G. P. (ed) Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations. New York: Plenum Press, (1996); P. 3-24.
 158. _____ Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. En : J. Urol. Vol. 455, (2000); P. 111-127.
 159. SINGH, N. P., McCOY, M., TICE, R. and SCHNEIDER, E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. En : Exp. Cell Res. Vol. 175, (1988); P. 184-191.
 160. SINGH, N. P., STEPHENS, R., SINGH, H., and LAI, H. Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. En : J. Urol. Vol. 429, (1999); P. 159-168.
 161. SLAMENOVA, D., GABELOVA, A. and RUZEKOVA, L. Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. En : J. Urol. Vol. 383, (1997); P. 243-252.
 162. SNYDER, R. and ANDREWS, L. Toxic effects of solvents and vapors Casarett and Doull's toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill, (1996); P. 737-771.

163. SNYDER, R. and MATHESON, D. Nick translation--a new assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts. En : Environ. Mutagen. Vol. 7, (1985); P. 267-279.
164. SPEIT, G. and HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). En : Mutagenesis. Vol. 10, (1995); P. 555-559.
165. _____ The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. En : Methods Mol. Biol. Vol. 113, (1999); P. 203-212.
166. SUL, D., LEE, D., IM, H., OH, E., KIM, J. and LEE, E. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. En : Toxicol. Lett. Vol. 134, (2002); P. 87-95.
167. SWANEPOEL, A., PETRORIUS, P., LAUBSCHER, P. and LABUSCHAGNE, W. Evaluation of DNA Damage and DNA Repair by the Comet Assay in Workers Exposed to Organic Solvents. En : IOHA. Vol. 2, (2005); P. 1-12.
168. TAFAZOLI, M. and KIRSCH-VOLDERS, M. *In vitro* mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. En : J. Urol. Vol. 371, (1996); P. 185-202.
169. THÉRON, P., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., DAVIT-SPRAUL, A., CONTI, M., and LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. En : Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. Vol. 3, (2000): P. 373-384.
170. THIER, R., GOLKA, K., BRUNING, T., KO, Y. and BOLT, H. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts. En : Toxicol. Lett. Vol. 127, (2002); P. 321-327.
171. TICE, R., AGURELL, E. and ANDERSON, D. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 35, (2000); P. 206-221.
172. TICE, R. and ANDREWS, P. Protocol for application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in eukaryotic cells. Supplied by confocal technologies. (1993).

173. TICE, R., ANDREWS, P., HIRAI, O. and SINGH, N. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. En : Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 283, (1991); P. 157-164.
174. TRISNAWATY, A., LAURENCE, Y., SABATIER, R. and CANO, J. *In vitro* detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. En : J. Urol. 468, (2000); P. 227-234.
175. TUDEK, B., VANZEELAND, A., KUSMIEREK, J. and LAVAL, J. Activity of Escherichia coli DNA glycosylase on DNA damage by methylating and ethylating agents and influence of 3-lines substituted adenine derivatives. En : J. Urol. Vol. 407, (1998); P. 169-176.
176. TUO, J., LOFT, S., THOMSEN, M. and POULSEN, H. Benzene-induced genotoxicity in mice *in vivo* detected by the alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition. En : J. Urol. Vol. 368, (1996); P. 213-219.
177. UHL, M., HELMA, C. and KNASMULLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. En : J. Urol. Vol. 468, (2000); P. 213-225.
178. VILLANI, P., ALTAVISTA, P., CASTALDI, L., LETER, G. and CORDELLI, E. Analysis of DNA oxidative damage related to cell proliferation. En : J. Urol. 464, (2000); P. 229-237.
179. WALLACE, L. Major Sources of Exposure to Benzene and Other Volatile Organic Chemical. En : Risk Analysis. Vol. 10, (1990); P. 59-64.
180. WHYSNER, J., REDDY, M., ROSS, P., MOHAN, M. and LAX, E. Genotoxicity of benzene and its metabolites. En : J. Urol. Vol. 566, (2004); P. 99-130.
181. WICHMANN, G., MUHLENBERG, J. and FISCHADER, G. An experimental model for the determination of immunomodulating effects by volatile compounds. En : Toxicol. *In vitro*. Vol. 19, (2005); P. 685-693.
182. YAGER, J., EASTMOND, D., ROBERTSON, M., PARADISIN, W. and SMITH, M. Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. En : Cancer Res. Vol. 50, (1990); P. 393-399.
183. ZARANI, F., PAPAZAFIRI, P. and KAPPAS, A. Induction of micronuclei in human lymphocytes by organic solvents *in vitro*. En : J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Vol. 18, (1999); P. 21-28.
184. ZENGİN, E., SAYGI, A., KORAY, M., ZOR, E., OZTEK, I. and KOKOĞLU, E. Alterations in superoxide dismutase activities. Lipid peroxidation and

glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. En : Pharmacology research. Vol. 38, (1998); P. 209-214.

185. ZHANG, L., YANG, W., HUBBARD, A. and SMITH, M. Nonrandom aneuploidy of chromosomes 1, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, and 21 induced by the benzene metabolites hydroquinone and benzenetriol. En : Environ. Mol. Mutagen. Vol. 45, (2005); P. 388-396.
186. ZHOU, B. and ELLEDGE, S. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. En : Nature. Vol. 408, (2000); P. 433-439.
187. ZHU, C., LAM, T. and JIANG, C. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. En : J. Urol. Vol. 491, (2001); P. 173-181.
188. ZUNINO, F., PEREGO, P., PILOTTI, S., PRATESI, G., SUPINO, R. and ARCAMONE, F. Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. En : Pharmacol. Ther. Vol. 76, (1997); P. 177-185.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

DONNER, M., MAKI-PAKKANEN, J., NORPPA, H. and SORSA, M. Genetic toxicology of xylenes. En : Mutat. Res. Vol. 74, (1980); P. 171-172.

FERON, V., CASSEE, F. and GROTEN, J. Toxicology of Chemical Mixtures: International Perspective. En : Environmental Health Perspectives. Vol. 106. No. 6, (1998); P. 1281-1289.

HOYOS, L. Exposición ocupacional, biomarcadores de riesgo de cáncer en los programas de vigilancia epidemiológica ocupacional para la prevención. En : Salud UIS. Vol. 38. No. 1, (2006); P. 29-39.

MONROY, C., CORTÉS, A., SICARD, D. and GROOT, H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. En : Biomédica. Vol. 25, (2005); P. 335-45.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!