

**EFFECTO APOPTOTICO *in vitro* INDUCIDO POR EL TÍNEN EN LINFOCITOS  
HUMANOS AISLADOS DE SANGRE PERIFÉRICA, EVALUADO MEDIANTE  
CITOMETRÍA DE FLUJO**

**JEANNETTE VIRGINIA MOSQUERA MANZANO  
JONATAN VALENCIA PAYAN**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y  
CITOGENÉTICA  
POPAYÁN  
2008**

**EFFECTO APOPTOTICO *in vitro* INDUCIDO POR EL TÍNTER EN LINFOCITOS  
HUMANOS AISLADOS DE SANGRE PERIFÉRICA, EVALUADO MEDIANTE  
CITOMETRÍA DE FLUJO**

**JEANNETTE VIRGINIA MOSQUERA MANZANO  
JONATAN VALENCIA PAYAN**

**Trabajo de grado presentado para optar el título de Biólogo**

**Directora  
Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo**

**Asesores  
Esp. Gloria Inés Ávila  
Mg. Silvio Marino Carvajal**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y  
CITOGENÉTICA  
POPAYAN  
2008**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

**Firma del director**  
**Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo**

---

**Firma del jurado**  
**Msc. Claudia Patricia Acosta**

---

**Firma del jurado**  
**Mg. Patricia Eugenia Vélez V.**

**Fecha de sustentación: Popayán, 28 de julio de 2008**

*Agradezco a Dios las oportunidades que me brinda día a día y el haberme permitido t mis estudios profesionales como Bióloga que me ofrece la posibilidad de ser una persona útil a mi Familia y a la Sociedad.*

*Agradezco también a:*

*Mi madre Sonia Nery Manzano V. por su amor y entrega incondicional, su comprensión, sus consejos, por confiar en mí y ayudarme a alcanzar esta meta.*

*Mi padre Olmedo Mosquera R. que estando en el cielo siempre he sentido su compañía y apoyo.*

*Mis hermanas Nathalia y Laura Daniela Mosquera M. quienes son un motivo más para luchar cada día y salir adelante.*

*A Breyner E. Pérez por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional.*

*Jenatan Valencia porque con él constituí el mejor equipo para sacar adelante este proyecto.*

*Todos mis compañeros, amigos y familiares quienes directa o indirectamente aportaron para este logro.*

*Jeannette Virginia Mosquera Manzano*

*A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*Con mucho cariño a mis padres Deyanira Payan y Renzo Valencia que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. A mi madre Por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mi padre por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, dándome el valor para salir adelante.*

*A mis hermanos Carmen Julieth y Cristian Heidelberg Valencia quienes son el motivo para plantear y lograr todos mis objetivos.*

*A mi novia Dayana Moreno, por estar a mi lado brindándome su amor y el apoyo necesario para alcanzar esta meta.*

*A Virginia Mosquera porque juntos sacamos adelante el proyecto.*

*A compañeros y familiares que creyeron en mí y me apoyaron para realizar este sueño.*

*Jonatan Valencia Payan*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios por ser quien nos da el soporte de nuestras vidas y nos ayuda en todo momento

A nuestros padres por su dedicación y apoyo.

A nuestros profesores por todas las enseñanzas brindadas durante la carrera.

A nuestra directora de trabajo de grado, Mg. Luz Stella Hoyos, por su contribución en el desarrollo de este proyecto.

A la Esp. Gloria Ínes Ávila quien con su experiencia profesional y asesoría continúa contribuyo a llevar a feliz término esta meta.

Al Mg. Silvio Carvajal por su valiosa colaboración y asesoría estadística en la realización de este proyecto.

Al grupo de investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por brindarnos su colaboración y por el apoyo técnico y financiero para la ejecución de este proyecto.

A nuestros compañeros y amigos por brindarnos su apoyo, motivación y colaboración.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
2. HIPÓTESIS	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. ANTECEDENTES	26
4.1 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS DE ALGUNOS SOLVENTES ORGÁNICOS	26
4.2 SOLVENTES ORGÁNICOS Y MUERTE CELULAR	27
4.3 CARCINOGENICIDAD DE LOS SOLVENTES ORGÁNICOS	27
4.3.1 Tolueno	27
4.3.2 Etilbenceno	28
4.3.3 Xileno	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
6. MARCO TEÓRICO	30
6.1 SOLVENTES ORGÁNICOS	30
6.2 TÍNER	30
6.2.1 Componentes básicos del tiner	30

6.2.1.1 Solventes activos o disolventes	30
6.2.1.2 Cosolventes, no solventes o solventes latentes	30
6.2.1.3 Diluyentes, base o soporte	31
6.2.1.4 Retardadores	31
6.3 MODELOS EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i>	31
6.4 BIOMARCADOR	32
6.5 MUERTE CELULAR	32
6.5.1 Apoptosis	32
6.5.1.1 Cambios celulares en la muerte apoptótica	33
6.6 CITOMETRÍA DE FLUJO	35
6.6.1 Generación de dispersión y fluorescencia	35
6.6.2 Obtención de los datos e interpretación	37
6.6.3 Propiedades de dispersión de la luz de las células muertas	38
6.6.4 Anexina V y citometría de flujo	39
6.6.5 Aplicaciones e importancia	40
7. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	41
7.1 TIPO DE ESTUDIO	41
7.2 SELECCIÓN DE CONTROLES	41
7.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	42
7.4 CONTEO CELULAR	42
7.5 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	42

7.6 TRATAMIENTOS	43
7.7 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	43
7.7.1 Prueba de Índice Mitótico	43
7.7.1.1 Cosecha del cultivo celular	44
7.7.1.2 Selección de dosis experimentales	44
7.8 CINÉTICA DE MUERTE CELULAR EN FUNCION DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO	44
7.9 PRUEBA DE APOPTOSIS MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA V-FITC Y YODURO DE PROPIDIO	45
7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
8. RESULTADOS	51
8.1 ENSAYOS PRELIMINARES Y COMPENSACIÓN	51
8.2 EFECTO CITOTÓXICO	51
8.2.1 Índice mitótico	51
8.3 CINÉTICA DE MUERTE CELULAR EN FUNCION DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	53
8.4 EFECTO APOPTÓTICO MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA V Y YODURO DE PROPIDIO (IP) EVALUADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	58
9. DISCUSIÓN	64
9.1 CITOTÓXICIDAD EN LINFOCITOS TRATADOS CON TÍNER	65
9.2 CINÉTICA DE MUERTE EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO AL TÍNER	67
9.3 EFECTO APOPTÓTICO EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON TÍNER	68
10. CONCLUSIONES	73

11. IMPACTO	74
12. RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Componentes del tiner según ECOPETROL, analizadas por cromatografía de gases mediante la prueba del piano.	31
Tabla 2. Fluorocromos más utilizados en FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting).	37
Tabla 3. Índice mitótico de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones de tiner.	52
Tabla 4. Apoptosis en linfocitos humanos <i>in vitro</i> inducida por el tiner durante 24 horas de tratamiento, evaluado a través de citometría de flujo mediante el marcaje con anexina V y yoduro de propidio.	59
Tabla 5. Viabilidad celular (%) de linfocitos humanos (aislados) después de 24 horas de tratamiento <i>in vitro</i> con tiner	62

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismos de muerte celular	33
Figura 2. Representación esquemática del ensayo de Anexina V	34
Figura 3. Propiedades de la dispersión de la luz de una célula	35
Figura 4. Espectro de absorción de cuatro fluorocromos comunes	36
Figura 5. Espectro de emisión de los fluorocromos mostrados en la anterior figura.	36
Figura 6. Representaciones gráficas de los datos obtenidos en el FACS.	37
Figura 7. Análisis mediante citometría de flujo de las características morfológicas de células muertas	38
Figura 8. Análisis mediante citometría de flujo de células apoptóticas utilizando anexina V-FITC	39
Figura 9. Protocolo de siembra de linfocitos aislados para la prueba índice mitótico	44
Figura 10. Protocolo de siembra de linfocitos aislados para la determinación de la cinética de muerte celular	45
Figura 11. Protocolo de siembra para la evaluación de apoptosis mediante citometría de flujo.	46
Figura 12. Asociación cuadrática negativa entre el IM de linfocitos humanos aislados tratados <i>in vitro</i> y las diferentes concentraciones de tíner durante 24 horas.	53
Figura 13. Análisis de muerte celular de linfocitos humanos aislados cultivados y tratados <i>in vitro</i> con el tíner por medio de citometría de flujo.	56
Figura 14. Cinética de la muerte celular de linfocitos humanos aislados, tratados <i>in vitro</i> con tíner a diferentes tiempos.	57
Figura 15. Efecto apoptótico en linfocitos humanos aislados de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de tíner durante 24 horas.	59

Figura 16. Asociación lineal positiva entre la muerte celular apoptótica en linfocitos humanos aislados tratados <i>in vitro</i> durante 24 horas y la concentración de tiner.	60
Figura 17. Análisis de apoptosis de linfocitos humanos aislados cultivados y tratados <i>in vitro</i> con el tiner por medio de citometría de flujo.	61
Figura 18. Viabilidad celular (%) de linfocitos humanos (aislados) después de 24 horas de tratamiento <i>in vitro</i> al tiner.	62
Figura 19. Asociación cuadrática entre las concentraciones del tiner y la viabilidad celular (%) de linfocitos humanos (aislados) después de 24 horas de tratamiento <i>in vitro</i> .	63

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Diseño experimental prueba de citotoxicidad mediante índice mitótico	47
Cuadro 2. Diseño experimental cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento	48
Cuadro 3. Diseño experimental prueba de apoptosis y prueba de viabilidad celular	49
Cuadro 4. Descripción de las variables	49
Cuadro 5. Muerte celular (%) de linfocitos humanos aislados <i>in vitro</i> inducida por el tiner a diferentes concentraciones y evaluado mediante citometría de flujo por medio de características morfológicas.	55

## RESUMEN

El tñner es uno de los solventes orgánicos más utilizados en la industria de las pinturas, tintas y resinas. Se han realizado estudios que han relacionado la exposición ocupacional crónica a componentes del tñner como el benceno, xileno y tolueno con el desarrollo de diversos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas, pero estudios sobre las implicaciones del compuesto como tal son pocos o nulos. Las células presentan diversos mecanismos como la apoptosis para contrarrestar los efectos adversos de este tipo de sustancias. La muerte celular apoptótica está acompañada por cambios en la estructura de la membrana plasmática como la exposición en la superficie de fosfatidilserina (PS). La exposición en la superficie de PS puede ser detectada por su afinidad con la anexina V, una proteína de unión a fosfolípidos. Se ha encontrado que la apoptosis es fácilmente detectada y cuantificada con Anexina V-FITC por medio de citometría de flujo. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto apoptótico inducido por el tñner en linfocitos humanos de sangre periférica. La citotoxicidad se determinó mediante la prueba de índice mitótico y la prueba de viabilidad celular durante 24 horas de tratamiento con tñner a diferentes concentraciones. Se realizó la cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento, en cultivos de linfocitos tratados durante 0.5, 1, 4, 6 y 24 horas con tñner a concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4  $\mu\text{L/mL}$ , mediante citometría de flujo basándose en las propiedades de la dispersión de la luz de las células. Lo que permitió identificar en cual de los diferentes tiempos se presentó un mayor porcentaje de muerte celular. El efecto apoptótico se evaluó en cultivos tratados durante 24 horas con las concentraciones altas, media y baja de tñner mediante el marcaje con anexina V y yoduro de propidio a través de citometría de flujo. Los resultados de citotoxicidad mostraron una disminución en el índice mitótico y en la viabilidad de los linfocitos, presentando un efecto dependiente de la concentración ( $R^2=0,963$ ,  $P<0.001$  y  $R^2= 0,927$ ,  $P<0.001$  respectivamente). La cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento al tñner, evidenció un incremento significativo estadísticamente de muerte celular de linfocitos humanos aislados, con respecto al control negativo (DMSO). Además, se deduce que la variabilidad del porcentaje de muerte celular está influenciado principalmente por el tiempo de exposición ( $F=40.348$ ;  $P<0,001$ ). Al evaluar el efecto apoptótico del tñner *in vitro* en linfocitos humanos aislados se identificó una diferencia significativa estadísticamente ( $P<0,0001$ ) en el porcentaje de muerte celular apoptótica de linfocitos tratados con tñner con respecto al control negativo (DMSO), donde se concluye que a medida que aumenta la concentración del tñner incrementa el porcentaje de apoptosis en linfocitos. De igual forma, se establece una asociación lineal entre el porcentaje de apoptosis temprana ( $R=0.935$ ), apoptosis tardía ( $R=0.912$ ), y la concentración de tñner. Dicha asociación se caracteriza por una relación concentración-efecto positiva entre la muerte celular apoptótica y las concentraciones de tñner. Lo anterior demuestra que el tñner interactúa con estructuras celulares de los linfocitos de importancia biológica para la homeostasis celular, como la membrana celular y el DNA. En conclusión, los componentes del tñner inducen citotoxicidad y apoptosis en linfocitos humanos aislados bajo las condiciones dadas en este estudio, posiblemente por daño oxidativo (especies reactivas de oxígeno y radicales libres) del material genético y/o

por desregulación en la homeostasis de las concentraciones del calcio intracelular ( $\text{Ca}^{+2}$ ). El incremento de la muerte celular apoptótica en los linfocitos humanos aislados de sangre periférica encontrado en este estudio, se relaciona con una disminución de la viabilidad de estas células de gran importancia para la respuesta inmune, lo que permite alertar a las personas que se encuentran constantemente expuestas a este tipo de mezclas complejas de solventes. Se hace necesario realizar más estudios sobre el efecto apoptótico de mezclas complejas de solventes orgánicos como el tiner, que permiten determinar el mecanismo de activación de la muerte celular apoptótica inducida por este tipo de químicos.

**Palabras claves:** tiner, *in vitro*, daño citotóxico, muerte celular, apoptosis, citometría de flujo.

## INTRODUCCIÓN

Los solventes orgánicos son hidrocarburos sencillos o una mezcla de estos, ampliamente utilizados en el sector industrial principalmente para la disolución de compuestos orgánicos como las pinturas, tintas y resinas. Uno de los solventes orgánicos más utilizados en la industria y en el hogar es el tiner (mezcla compleja), que tiene como solvente principal al tolueno, como cosolvente al benceno y como diluyente a una serie de solventes adjuntos [119]. Una de las principales características de los solventes es su volatilidad, razón por lo cual existe generación de emisiones difusas, no intencionales, de vapores de estas sustancias durante las distintas aplicaciones. Al evaporarse rápidamente se concentran en espacios confinados y son absorbidos por el ser humano a través de la piel y por inhalación. Debido a sus propiedades liposolubles, luego de ingresar al organismo se concentran en tejidos grasos, acumulándose hasta alcanzar concentraciones que producen diversos efectos negativos para la salud, inmediatos o de largo plazo [129]. La exposición a solventes orgánicos representa un importante problema de salud debido a la presencia de grandes cantidades de estos químicos en el ambiente. Se conoce que los solventes orgánicos son depresores del sistema nervioso central, produciendo efectos tales como dolor de cabeza, náusea, confusión, coma y hasta la muerte, dependiendo del nivel de exposición [55, 72].

Existe una preocupación creciente sobre los efectos adversos en el sistema inmune humano provocados por la exposición ambiental a bajas concentraciones de solventes orgánicos por periodos prolongados de tiempo, aunque la información acerca de las alteraciones inmunológicas inducidas por la exposición a estos compuestos es muy limitada. Sin embargo hay evidencia de los efectos inmunotóxicos en animales y humanos expuestos a solventes orgánicos volátiles, así como de estudios *in vitro* [47, 70, 122, 154, 163]. Las células presentan diversos mecanismos de defensa, como la apoptosis para minimizar los efectos citotóxicos y genotóxicos generados por diversos xenobióticos. El proceso apoptótico puede ser activado como respuesta a cambios en la homeostasis del individuo o como método de defensa ante daños inducidos intracelular y extracelularmente, convirtiéndose en un biomarcador de gran importancia para cuantificar el daño causado en las células o tejidos de un organismo, debido a que ofrece ventajas únicas en la determinación de los efectos de mezclas químicas complejas y sus metabolitos en la salud de los organismos.

Debido a que existen pocos estudios que evalúen los efectos citotóxicos del tiner, tanto *in vivo* como *in vitro*, este estudio respondió los siguientes interrogantes: ¿El tratamiento *in vitro* con tiner de linfocitos humanos aislados, induce efecto citotóxico el cual se expresa en una alteración del índice mitótico? ¿Existe una relación entre la concentración del tiner, el tiempo de tratamiento y la muerte celular (apoptótica o necrótica) en linfocitos humanos aislados? ¿El tiner tiene la capacidad de inducir apoptosis *in vitro* en linfocitos humanos aislados?

En este estudio se evaluó el efecto citotóxico del tiner mediante el registro del índice mitótico, se investigó la cinética de la muerte celular en función del tiempo de tratamiento y de la concentración de tiner y se realizó la cuantificación del efecto apoptótico del tiner mediante pruebas *in vitro* en linfocitos humanos aislados de sangre periférica de una persona saludable (no fumador y no expuesto ocupacionalmente a solventes). Las células fueron tratadas durante 24 horas con el tiner para la prueba de índice mitótico (IM), durante 0.5, 1, 4, 6 y 24 horas para la determinación de cinética de muerte celular, mediante análisis de características morfológicas de los linfocitos por citometría de flujo y durante 24 horas para la cuantificación de apoptosis temprana mediante el marcaje con anexina V.

La aplicación de estas pruebas permitió alcanzar el objetivo de evaluar *in vitro* el efecto apoptótico del tiner en linfocitos humanos aislados mediante el marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) por citometría de flujo. Esto alerta sobre la posible alteración de la homeostasis tisular en personas expuestas ocupacionalmente a este solvente, y el riesgo de desarrollar diversos problemas de salud.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una preocupación creciente en la comunidad científica y de las entidades que manejan la salud pública, con respecto a los efectos en la salud causados por la exposición a químicos en el ambiente. Los contaminantes a nivel ocupacional comprenden diferentes clases de químicos a los cuales los individuos están generalmente expuestos a bajas concentraciones por periodos prolongados de tiempo. Entre estos químicos los de mayor preocupación son los solventes orgánicos volátiles, que tienen como blanco principal los sistemas nervioso e inmune de los humanos. Los solventes orgánicos son hidrocarburos sencillos o una mezcla de estos, ampliamente utilizados en el sector industrial principalmente para la disolución de compuestos orgánicos como las pinturas, tintas y resinas. La toxicidad de los solventes orgánicos en general y de los hidrocarburos aromáticos en particular (tolueno, xileno y benceno) es ampliamente reconocida en la literatura. Las razones de la toxicidad de estas sustancias y la diversidad de efectos adversos sobre el organismo, tiene su explicación en su gran afinidad por los tejidos ricos en grasas, como el sistema nervioso central y en sus propiedades fisicoquímicas que facilitan su absorción [55, 72].

La exposición a solventes orgánicos utilizados en numerosos procesos industriales, se considera un riesgo ocupacional que confrontan millones de trabajadores en el mundo. La problemática a escala mundial en relación con la exposición a estos solventes se ha centralizado con mayor atención en torno al benceno y sus derivados (Ej. tolueno), los cuales se consideran peligrosos para la salud inclusive a bajas concentraciones. Estimaciones hechas sobre la exposición a solventes en Estados Unidos por el **National Institute for Occupational Safety and Health** (NIOSH) ha sugerido que un gran número de trabajadores han tenido algún grado de exposición a tolueno, y un número aún mayor presentan potencial exposición a xileno [11].

Existen evidencias epidemiológicas que relacionan la exposición ambiental a solventes orgánicos y problemas de salud como el cáncer. En los años ochenta, más de un millón de personas estaban potencialmente expuestas a algún solvente orgánico específico en los Estados Unidos; en Canadá el 40% de los pacientes masculinos con cáncer habían estado expuestos a solventes; y en la población finlandesa un 1% estaba expuesto regularmente [90]. En Italia se considera que entre el 10 y el 16% de los trabajadores se encuentran expuestos a este tipo de sustancias. En Estados Unidos se calcula que cerca de cien mil trabajadores tienen algún tipo de exposición al tolueno y, aproximadamente, 140.000 al xileno. En Suecia se llega a afirmar que entre el 3 y el 4% de la población general se encuentra expuesta a los solventes orgánicos [141].

Aunque en menor escala, en nuestro país son muchas y variadas las empresas donde están incluidos estos solventes en sus procesos productivos. Entre ellas, la industria petroquímica, pinturas y tintes, pegamentos, plaguicidas, papel, cueros y calzado, presentando un alto riesgo carcinogénico [75, 76, 84, 144]. Igualmente, las realizadas en los salones de belleza

(cosméticos), laboratorios, tintorerías y hogar (manualidades y limpieza), representando todas fuentes de exposición a: tolueno, xileno, dimetilcetona, metilisobutilcetona (MIC), etanol, metanol, isobutanol, etc. [134].

En Colombia un gran porcentaje de la población se encuentra expuesta a solventes orgánicos tanto en la industria como a nivel domestico, sin tener en cuenta las normas de seguridad necesarias para la manipulación de este tipo de sustancias. Además, existen pocos estudios que evalúen los posibles riesgos en la salud causados por la exposición ocupacional a los solventes orgánicos. El Instituto Nacional de Salud encontró en una muestra de 190 trabajadores de fábricas de pinturas y pegantes en Bogotá, niveles elevados de metabolitos de solventes orgánicos en muestras de orina y se demostró un uso inadecuado e infrecuente de los elementos de protección personal [126]; y el Instituto de Seguros Sociales de Colombia con la cooperación del Centro de Neurociencias de Cuba, valoró los efectos sobre el sistema nervioso por exposición a solventes orgánicos o a sus mezclas en 157 trabajadores potencialmente expuestos en industrias del Valle del Cauca, lo que permitió detectar alteraciones funcionales del sistema nervioso [98].

Los solventes orgánicos han sido estudiados extensamente como compuestos simples (benceno, tolueno y xileno), para evaluar las asociaciones de exposición y efectos genotóxicos, neurotóxicos y carcinogénicos en poblaciones; pero muy pocos estudios se han realizado con mezclas complejas de solventes, por lo que es pertinente evaluar el efecto del tñner a nivel celular, debido a que se conoce que la exposición a una “combinación de compuestos” es más peligrosa por los efectos sinérgicos, aditivos y potenciadores de la mezcla resultante [52]. Uno de los solventes utilizados frecuentemente es el tñner, mezcla compleja de diferentes hidrocarburos, entre ellos el benceno, el tolueno y el xileno; los cuales han sido estudiados ampliamente y se ha demostrado que estos solventes y sus metabolitos causan daño al material genético, produciendo alteraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos [128, 130, 168]. También, ha sido asociada la exposición ocupacional crónica a este tipo de solventes con el desarrollo de enfermedades degenerativas [129] y diversos tipos de cáncer como el de pulmón, hígado, esófago, vejiga, próstata y leucemias [6, 18, 21, 132].

Para disminuir los efectos adversos en el organismo causados por la exposición a un gran número de sustancias, las células inician el proceso de muerte celular apoptótica como un mecanismo modulador de los daños inducidos por los xenobióticos. La apoptosis inducida por muchos químicos es consecuencia del bloqueo de la replicación de ADN, lo que conlleva a un colapso de la replicación y formación de rupturas de cadena doble [137]. Por esta razón, en esta investigación se evaluó el efecto citotóxico del tñner y su capacidad inductora de muerte celular, principalmente el efecto apoptótico *in vitro* en linfocitos humanos aislados, para identificar una posible interacción entre los componentes activos de la muestra compleja del tñner con estructuras celulares y/o el ADN, y predecir el posible riesgo de producir efectos secundarios como enfermedades en individuos expuestos.

Debido a que en Colombia y en el departamento del Cauca, la exposición ocupacional a solventes orgánicos, siendo el tñner el de mayor uso, presenta una asociación directa con el

incremento de alteraciones cromosómicas [68] y que además un estudio reciente empleando el ensayo cometa, establece al tiner como inductor de daño genético de linfocitos humanos tratados *in vitro* [65], es pertinente responder los siguientes interrogantes: ¿El tratamiento de linfocitos humanos *in vitro* con diferentes concentraciones de tiner induce efecto citotóxico el cual se refleja en una alteración del índice mitótico? ¿Existe una relación entre la concentración del tiner (concentración alta, media y baja), el tiempo de tratamiento y la muerte celular (apoptótica o necrótica) en linfocitos humanos aislados? ¿El tiner tiene la capacidad de inducir apoptosis *in vitro* en linfocitos humanos aislados?

## 2. HIPÓTESIS

Si el tratamiento con tiner de linfocitos humanos aislados, en cultivos *in vitro*, tiene efecto citotóxico, se espera que el índice mitótico (IM) disminuya ( $H_i$ ) del registrado en los linfocitos no tratados con tiner (control negativo), de lo contrario el IM será igual o incluso mayor ( $H_0$ ).

Si el tiempo de tratamiento con tiner de linfocitos humanos aislados, en cultivos *in vitro*, influye en la muerte celular, se espera un incremento directamente proporcional entre la frecuencia de células muertas, la concentración del tiner y el tiempo de exposición ( $H_i$ ), de lo contrario la frecuencia será igual o incluso menor ( $H_0$ ).

Si el tratamiento con tiner de linfocitos humanos aislados, en cultivos *in vitro*, tiene efecto apoptótico, se espera que la frecuencia de células apoptóticas se incremente respecto a la frecuencia registrada en los linfocitos no tratados con tiner (control negativo) ( $H_i$ ), de lo contrario esa frecuencia será igual o incluso menor ( $H_0$ ).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de solventes orgánicos en múltiples aplicaciones industriales y algunas domésticas, representa un importante riesgo para la salud de los trabajadores, para la salud pública y para el medio ambiente. Los problemas en la salud ocasionados por los solventes orgánicos se conocen desde hace más de un siglo y han sido descritos recientemente en muchos estudios [17, 23, 103]. A bajas o moderadas concentraciones en el aire, los solventes orgánicos pueden causar diversos síntomas como euforia, dolor de cabeza y vértigo, mientras que a altas concentraciones, se puede presentar anestesia, enfermedades cardiovasculares y respiratorias y eventualmente llevar a la muerte [12, 160]. Además de estos efectos agudos, se sabe que los solventes orgánicos pueden provocar desordenes en el sistema nervioso, como déficits cognitivos y emocionales, tras exposiciones a largo plazo.

El **National Institute for Occupational Safety and Health's** (NIOSH), estimó que aproximadamente 10 millones de trabajadores en Estados Unidos están potencialmente expuestos a solventes orgánicos. Muchos trabajadores se encuentran en riesgo de exposición porque los solventes orgánicos son ampliamente usados en la actualidad (NIOSH). El benceno, el tolueno y el xileno son los solventes orgánicos de mayor uso en la industria. La problemática a escala mundial en relación con la exposición a los hidrocarburos aromáticos se ha centralizado con mayor atención en torno al benceno, el cual se considera peligroso para la salud, aun en concentraciones bajas. Otros solventes a los que muchos trabajadores están expuestos incluyen los hidrocarburos halogenados como: Tetracloroetileno, tricloetileno y tetracloruro de carbono [149].

Los solventes pueden actuar como reguladores de la expresión de algunos genes aumentando o disminuyendo la síntesis o actividad de algunas proteínas o modificando la velocidad de las actividades metabólicas. El contacto permanente y prolongado con estos agentes químicos, puede provocar diversas e irreversibles mutaciones al ADN de estos individuos, las cuales se verán reflejadas en las alteraciones del metabolismo o funcionamiento del organismo, produciendo así graves repercusiones clínicas, efectos mutagénicos y carcinogénicos [26].

Muchos trabajadores colombianos, en su cotidianidad laboral y tal vez sin saberlo, están expuestos o en contacto con solventes orgánicos como el benceno, tolueno y xileno, lo cual puede terminar ocasionando graves daños a la salud del mismo y de su familia. En nuestro país, la exposición a solventes orgánicos se ha caracterizado como un problema de salud pública, por la gran utilización en la industria, por las formas inapropiadas de manipulación y por la disposición de estos productos que son causantes de contaminación ambiental y laboral. El tiner es una mezcla compleja de diferentes solventes orgánicos, ampliamente usado en el país para diluir o disolver sustancias insolubles en agua. Se han realizado estudios que han relacionado la exposición ocupacional crónica a componentes del tiner como el benceno, xileno y tolueno con el desarrollo de diversos tipos de cáncer y enfermedades neurológicas [61, 130].

Por lo tanto, se hace necesario realizar pruebas que permitan evaluar los efectos citotóxicos y mecanismos de respuesta celular desencadenados por esta mezcla, debido a que existen pocas referencias bibliográficas sobre los efectos del tiner en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. De ahí que la finalidad de esta investigación es realizar un estudio experimental *in vitro*, ya que estos proveen información importante que permite incrementar el conocimiento de los efectos adversos originados por algunos químicos. El uso de un método *in vitro* es conveniente, debido a los problemas éticos y económicos asociados con los experimentos en animales lo que ha hecho que se aumenten los esfuerzos para reemplazarlos por ensayos de toxicidad *in vitro* de rutina [36, 166]. Además las pruebas de toxicidad *in vitro* permiten reducir el número de variables y proporcionan condiciones de tratamiento definidas [54] permitiendo obtener resultados de los efectos adversos de la exposición al tiner a nivel celular.

Las células presentan diversos mecanismos como la muerte celular (el proceso mas importante es la apoptosis) para reducir los riesgos en los organismos por los efectos citotóxicos y genotóxicos de los xenobióticos. La muerte celular apoptótica no es utilizada únicamente para remover células en circunstancias fisiológicas, como se observa durante el desarrollo [159], sino que el proceso apoptótico puede ser activado como respuesta a cambios en la homeostasis del individuo o como método de defensa ante daños inducidos intracelular y extracelularmente, convirtiéndose en un biomarcador de gran importancia para cuantificar el daño causado en las células o tejidos de un organismo. De esta forma muchas células detectarían el daño o mal funcionamiento de procesos metabólicos vitales, y generarán señales que llevan a la activación de la muerte celular apoptótica.

Existe suficiente evidencia sobre el papel que juega la apoptosis en la patogénesis de un gran número de enfermedades humanas. En este contexto es útil considerar desórdenes como el sida, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades hematológicas que están asociados con el incremento en los niveles de apoptosis causando exceso de muerte celular y aquellos que están asociados con la disminución de dichos niveles (cáncer, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes) provocando una supervivencia celular prolongada [48]. Alteraciones en los mecanismos internos que controlan la apoptosis pueden llevar a un exceso de eliminación de células o a un incremento de acumulación celular, que contribuye al desarrollo de tumores permitiendo el incremento de mutaciones en los genes e inestabilidad genética [71].

La alteración del proceso apoptótico por acción de químicos se ha caracterizado como un biomarcador de respuesta no específico, debido a que se presenta como respuesta a la acción de una gran variedad de compuestos xenobióticos inductores de genotoxicidad y citotoxicidad [8]. Se puede argumentar que marcadores bioquímicos no específicos, como la apoptosis, ofrecen ventajas únicas en el establecimiento de los efectos de mezclas químicas complejas y metabolitos en la salud de los organismos y en el monitoreo ambiental incluyendo mayor sensibilidad, menor variabilidad y alta conservación en las diferentes especies [44, 102, 124].

En general, la apoptosis ha servido como marcador en células, tejidos y órganos y puede ser usada en modelos animales para determinar potenciales riesgos en los humanos. También es importante considerar la validez de la apoptosis como biomarcador de respuesta de efectos tóxicos provocados por solventes orgánicos. Su validez puede ser mayor cuando sea necesario tener una visión de los eventos bioquímicos tempranos y los efectos de la exposición química a tóxicos genéticos e inmunológicos. Se ha demostrado que un evento temprano del proceso apoptótico, es la pérdida en la asimetría de los fosfolípidos que conlleva a la externalización de fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática. La anexina V es una proteína que interactúa fuerte y específicamente con PS y puede ser usada para detectar apoptosis, teniendo como blanco la pérdida de la asimetría en la membrana plasmática [19, 64, 157, 162]. Koopman y colaboradores encontraron que la apoptosis podría ser fácilmente detectada y cuantificada con anexina V-FITC por medio de citometría de flujo [85].

En conclusión fue prioritario y pertinente realizar este estudio porque la problemática de exposición al tñer es motivo de preocupación, debido a su gran uso en los hogares y por el gran número de personas expuestas en Colombia de una forma aguda o crónica; y de igual forma, debido a que existe poca evidencia bibliográfica sobre el estudio de los efectos tóxicos de mezclas complejas de hidrocarburos como el tñer y los riesgos en la salud por exposición a este tipo de compuesto.

## 4. ANTECEDENTES

Existen pocos estudios que establezcan relaciones entre la exposición al tiner o mezclas de solventes orgánicos que incluyan benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, componentes principales del tiner, con efectos en la homeostasis celular y problemas de salud en humanos. Sin embargo se encontraron algunas evidencias científicas que soportan la posible alteración de la homeostasis celular por parte del tiner. La búsqueda de referencias bibliográficas se llevó a cabo en las siguientes bases de datos: Pubmed, Science Direct, Hinari, ISI web of Knowledge, Springer y Proquest.

### 4.1 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS DE ALGUNOS SOLVENTES ORGÁNICOS

Se ha establecido el potencial hematotóxico de algunos de los solventes orgánicos de mayor uso en las industrias y productos de uso común en los hogares. El mejor ejemplo es el benceno, que produce neoplasias en varios tejidos (hígado, sangre y medula ósea) en animales experimentales [165]. También se ha reportado que individuos expuestos ocupacionalmente al benceno, experimentan un incremento en el riesgo de desarrollar diversos tipos de neoplasias hematológicas, como linfomas malignos, y tipos de cáncer epitelial como el cáncer de pulmón [61].

La carcinogenicidad de solventes similares, como el tolueno, xileno y “white spirits” (mezcla compleja de solventes orgánicos), es más controversial, ya que la IARC concluyó que había evidencia inadecuada para demostrar la carcinogenicidad de estos químicos tanto en humanos como en modelos animales [74]. Sin embargo, algunos estudios recientes han encontrado un incremento en el riesgo de linfoma de Hodgking en trabajadores expuestos a una mezcla de estos solventes [90], aunque la mayoría de estos estudios presentan un número bajo de casos expuestos. De igual forma, la exposición en humanos a una mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno puede producir daños neurológicos y el benceno puede causar adicionalmente daños hematológicos que pueden llevar en última instancia al desarrollo de leucemia mielítica aguda, así como también existe evidencia de la carcinogenicidad del etilbenceno [67].

El benceno ha sido catalogado como carcinógeno humano por the National Toxicology Program (NTP) [116], U.S. Environmental Protection agency (EPA) [73] e Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) [77]. El etilbenceno es un químico posiblemente carcinogénico para humanos según estudios recientes de la IARC [73], basados en estudios con animales, mas no es catalogado carcinógeno humano por NTP [116]. El tolueno y los xilenos han sido catalogados como no carcinógenos humanos por EPA [73] e IARC [78, 80], lo que demuestra la falta de evidencia para la carcinogenicidad de estos dos químicos.

Se han realizado estudios para determinar las posibles interacciones de mezclas de benceno, tolueno y xileno usando un ensayo *in vitro* del desarrollo embrionario de ratones , donde se observó que la respuesta a esta mezcla de químicos (determinada por el grado de retraso en

el crecimiento y desarrollo del embrión), fue similar a las respuestas obtenidas con los componentes de forma individual, sugiriendo que el benceno, tolueno y xileno actúan conjuntamente de forma aditiva [22].

## **4.2 SOLVENTES ORGÁNICOS Y MUERTE CELULAR**

Existe una gran cantidad de agentes tóxicos capaces de inducir muerte celular, principalmente por el mecanismo apoptótico, entre los cuales se encuentran el etanol, especies reactivas de oxígeno, las radiaciones ionizantes y drogas quimioterapéuticas. A pesar que se ha demostrado que biomarcadores no específicos como la apoptosis ofrecen ventajas únicas en el establecimiento de los efectos tóxicos de mezclas químicas complejas y de sus metabolitos en los organismos, existen pocos estudios que relacionen la exposición a solventes orgánicos y la apoptosis.

Uno de los solventes orgánicos más estudiados es el benceno; Sin embargo, gran parte de los estudios han sido dirigidos a establecer el potencial genotóxico de este compuesto, y en menor proporción a determinar su citotoxicidad. El efecto carcinogénico de este químico es atribuido a la capacidad que tienen sus metabolitos para producir especies reactivas de oxígeno que interaccionan con el DNA, inhibiendo la apoptosis o permitiendo una prolongación aberrante de la supervivencia celular, que puede contribuir al desarrollo de cáncer al facilitar la presencia de mutaciones [71].

Los metabolitos del benceno han mostrado un efecto tóxico bien marcado a bajas concentraciones, mientras que otros solventes como el tolueno, el xileno y una mezcla de los tres, presenta un efecto tóxico pequeño o casi nulo aún a grandes concentraciones [109]. Dentro de los metabolitos derivados del benceno, el ácido mucorónico tiene la capacidad de inducir apoptosis en linfocitos humanos y de ratones [93], la p-benzoquinona y las hidroquinonas fueron capaces de inducir apoptosis a bajas concentraciones (100  $\mu$ M) en células premyelocíticas HL-60, debido a su habilidad de inducir fuertes daños en el DNA [66]. Otros metabolitos del benceno como el catecol, fenol y 1,2,4-benzenotriol mostraron una gran capacidad de inducir apoptosis en células madre de médula ósea a muy bajas concentraciones [106].

## **4.3 CARCINOGENICIDAD DE LOS SOLVENTES ORGÁNICOS**

Muchos solventes han mostrado algunos efectos citotóxicos en estudios de corto plazo. Se ha encontrado un incremento de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de trabajadores expuestos a benceno, cloruro de metileno y estireno [1, 2, 125] y un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas en células de mamíferos tratadas con clorometano y 1,2-dicloroetano [3, 4].

**4.3.1 Tolueno.** Son pocos los estudios realizados sobre los efectos tóxicos *in vitro* del tolueno, sin embargo existen investigaciones que incluyen el análisis de la respuesta de modelos animales frente a la exposición al tolueno y diversos estudios con poblaciones expuestas. Dobrokhotov expuso ratones machos a tolueno a una concentración de 610

mg/m<sup>3</sup> por 4 horas diarias durante 4 meses, y reportaron un incremento reversible en gaps y rupturas cromosómicas en células de médula ósea [40].

La mayoría de los estudios con trabajadores expuestos al tolueno no han reportado diferencias en la incidencia de aberraciones cromosómicas entre trabajadores expuestos al tolueno e individuos control [49, 50, 92]. De igual forma las personas expuestas al tolueno no han demostrado un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) [50, 58, 135], daño genético mediante análisis con la prueba cometa [130] o retraso en el ciclo celular [135]. Sin embargo, algunos estudios con trabajadores expuestos han encontrado un aumento en las rupturas cromosómicas, ICHs y gaps en comparación con los controles [14]. En otros estudios se ha encontrado un incremento en el índice de micronúcleos, mas no de ICHs, en cultivos de linfocitos de sangre periférica en una población de trabajadores de una fábrica de zapatos [130].

**4.3.2 Etilbenceno.** Este compuesto no presentó actividad genotóxica en la mayoría de los estudios. Trabajadores expuestos a niveles bajos de etilbenceno en una planta de estireno no mostraron aumento formación de aductos, en ICHs o micronúcleos en linfocitos de sangre periférica [67]. Se observó una ligera respuesta positiva en linfocitos humanos tratados *in Vitro* con etilbenceno, manifestada en ICHs, pero solo a concentraciones que fueron tóxicas para la célula [120].

**4.3.3 Xileno.** La genotoxicidad de los xilenos comerciales y de los tres isómeros individuales ha sido estudiada, y los resultados son, para la mayoría negativos [81]. Todos los estudios citados en la base de datos GENE-TOX son negativos con la excepción de un estudio en el cual la conclusión era confusa. Los xilenos no inducen alteraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas en células de ovario de hamster chino [9] o en cultivos de linfocitos humanos [51], alteraciones cromosómicas en medula ósea de rata, micronúcleos en medula ósea de ratón [104], o anormalidades en la cabeza de los espermatozoides en ratas [161]. No se encontró un incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas observadas en linfocitos periféricos de individuos expuestos a xilenos ocupacionalmente [123] o en estudios experimentales [135].

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada hasta el momento, se puede asegurar que la información disponible acerca de los efectos apoptóticos inducidos por el tiner, como mezcla compleja de solventes es insuficiente. Por lo tanto se hace conveniente desarrollar nuevos métodos de estudio que permitan la evaluación de mezclas complejas como el tiner. Razón por la cual, este estudio brinda un importante aporte en el conocimiento científico sobre la toxicología de mezclas complejas; y del efecto inducido de manera conjunta, posiblemente por el efecto sinérgico, aditivo o potenciador de la mezcla resultante.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar *in vitro* el efecto apoptótico inducido por el tñer en linfocitos humanos de sangre periférica.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar el efecto citotóxico inducido por el tñer en linfocitos humanos aislados, mediante la prueba citogenética de índice mitótico.

Establecer *in vitro* la cinética de muerte celular (apoptótica y necrótica) en función de la concentración de tñer y el tiempo de tratamiento en linfocitos humanos aislados, mediante características morfológicas por citometría de flujo.

Evaluar *in vitro* el efecto apoptótico del tñer en linfocitos humanos, por citometría de flujo mediante marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 SOLVENTES ORGÁNICOS

Los solventes son compuestos de naturaleza orgánica, utilizados para disolver y diluir sustancias insolubles en agua, como las pinturas, los aceites o las grasas. Generalmente, están constituidos por un solvente activo, un cosolvente y un diluyente. El solvente activo es el que tendrá un efecto directo sobre lo que se está disolviendo, el cosolvente potenciará el efecto del solvente activo y el diluyente dará volumen al compuesto [119]. Las propiedades de cada solvente, relacionadas estrictamente con su estructura química, determinan sus aplicaciones, el grado de dispersión en el ambiente y el perfil toxicológico para los sujetos expuestos [149].

Las características de los solventes orgánicos permiten que sean utilizados para lavar y desengrasar muchos materiales, para la extracción y síntesis de productos químicos y para la producción de una variedad de productos usados en la vida diaria [30, 37]. La producción y el uso de pinturas y colorantes representa la fuente principal de exposición ocupacional a solventes orgánicos en la actualidad. De hecho, cerca del 50% de los solventes sintetizados son empleados para la producción de pinturas y adelgazantes, donde el papel específico de los solventes es evaporarse después de haber solubilizado y diluido la pintura, la cual, la mayoría de las veces es aplicada por spray.

### 6.2 TÍNER

Se considera al tñner como sinónimo de disolvente, aunque en realidad es una mezcla balanceada de varias sustancias orgánicas volátiles. En la industria se emplea para la elaboración de pegamentos, pinturas, lacas, barnices, tintes y productos relacionados; con el fin de reducir su viscosidad, disminuir los costos y controlar la velocidad de evaporación [56].

#### 6.2.1 Componentes básicos del tñner

**6.2.1.1 Solventes activos o disolventes:** Son líquidos volátiles altamente polares, capaces de disolver la nitrocelulosa y otras resinas sintéticas a cualquier concentración y que son difíciles de ser puestas en solución. 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 etilcetona (MEK) y metil isobutil cetona (MIBK) [119].

**6.2.1.2 Cosolventes, no solventes o solventes latentes:** Se encuentran los alcoholes. Se utilizan comúnmente el alcohol isopropílico, el alcohol n-propílico, el isobutanol, el n-butanol, el alcohol metílico, el alcohol amílico y el alcohol etílico.

**6.2.1.3 Diluyentes, base o soporte:** Son los hidrocarburos y parafinas, los cuales no tienen ningún poder disolvente sobre algunas resinas sintéticas pero en cambio disuelven las resinas naturales casi sin excepción. Los diluyentes utilizados en el thinner son el tolueno y xilenos, los cuales dan una buena relación de dilución de acuerdo al solvente activo que esté en uso.

**6.2.1.4 Retardadores:** Estos constituyentes inciden directamente sobre la velocidad de evaporación, evitando los 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.

Los rangos de utilización de los componentes en la fabricación de thinner para la fabricación de pinturas basadas en nitrocelulosa, son los siguientes: Disolvente activo, 16-22%; Cosolvente, 12-16%; Retardador 3 -9% Diluyente 55 -60%. [119]

A continuación se muestra los principales hidrocarburos encontrados en el thinner.

**Tabla 1.** Componentes del thinner según ECOPEPETROL, analizadas por cromatografía de gases mediante la prueba del piano [68].

Componentes	Thinner 0.14 (%)	Thinner 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	----
Etilbenceno	7.03	----
~ 50 compuestos más con una masa < 1%		

### 6.3 MODELOS EXPERIMENTALES DE TOXICIDAD *IN VITRO*

Los modelos experimentales empleados *in vitro* para valorar la toxicidad de los compuestos químicos se fundamentan en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato biológico es el material generalmente orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica *in vitro* el xenobiótico, y cuyas reacciones ante tal estímulo se quieren extrapolar al hombre. Estas alteraciones se valoran mediante los indicadores de toxicidad, que son los parámetros que determinamos para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato del ensayo. El valor predictivo del modelo experimental *in vitro* dependerá de la buena conjunción entre el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad aplicados, aunque también presentan gran

trascendencia el protocolo utilizado para la exposición al tóxico y el procedimiento empleado para evaluar la significación estadística de los resultados. El diseño de un modelo experimental *in vitro* supone la asociación armónica de cada uno de estos factores para obtener un sistema a microescala que permita predecir un determinado tipo de efecto tóxico. En este tipo de estudios es posible minimizar la ocurrencia de sesgos para garantizar la comparabilidad de las variables de interés, controlando los tratamientos de los cultivos [63].

## **6.4 BIOMARCADOR**

Los biomarcadores pueden ser definidos como las alteraciones homeostáticas inducidas por químicos o por el ambiente a nivel molecular, bioquímico o celular. Son de gran importancia por su uso y aplicación para la identificación de la naturaleza y cuantificación de la exposición química a nivel ambiental y ocupacional. Pueden ser aplicados en estudios experimentales o en el campo de monitoreo; y pueden ser destructivos o no destructivos al organismo de estudio [105]. Los biomarcadores moleculares son típicos indicadores de exposición, efecto, susceptibilidad y respuesta [114, 115]. Un biomarcador de exposición indica la presencia de una exposición previa a un agente ambiental; un biomarcador de efecto indica la presencia (y magnitud) de una respuesta biológica a la exposición a un agente ambiental; un biomarcador de susceptibilidad indica una elevada sensibilidad a los efectos de los agentes ambientales y por último un biomarcador de respuesta supervisa cuantitativa y cualitativamente la sucesión de cambios asociados con el stress celular inducido por xenobióticos y la toxicidad en múltiples tejidos [152]. Es importante considerar la validez de la apoptosis como un biomarcador de respuesta, ya que provee información sobre los eventos bioquímicos tempranos y los efectos de la exposición a agentes químicos inmunotóxicos, genotóxicos entre otros [8].

## **6.5 MUERTE CELULAR**

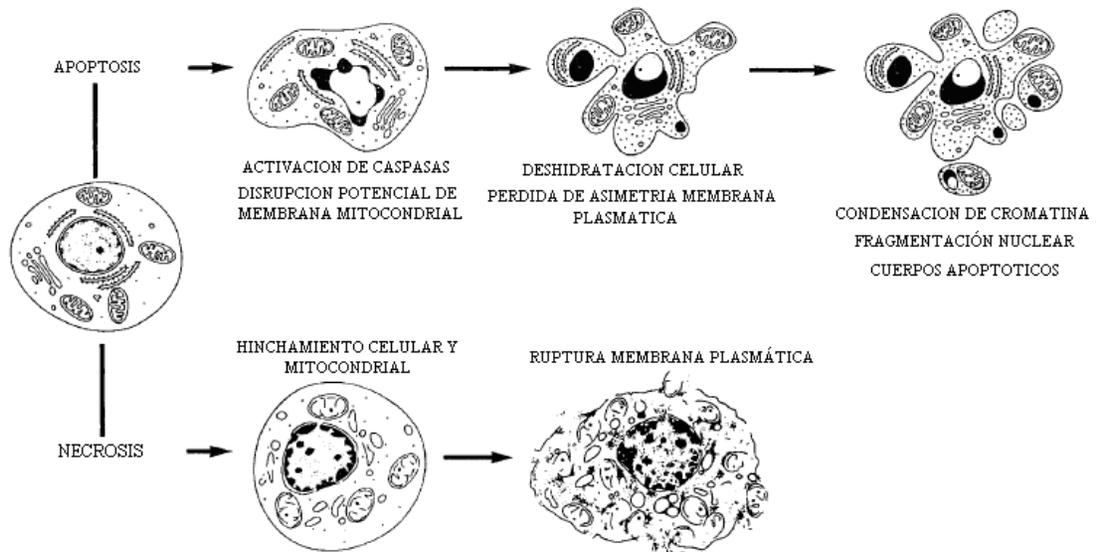
La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y muere en beneficio del organismo. En este caso, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso. Esto no se observa *in vivo* ya que las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis antes de perder la integridad de la membrana [108].

**6.5.1 Apoptosis.** La apoptosis fue descrita por primera vez durante los años 70 y se basó en las características morfológicas que presentan las células tales como la organización de la

membrana citoplasmática y condensación de la cromatina, entre otras [108]. Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, se presentarán diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula. Esto permite disponer de diferentes marcadores de la apoptosis. Cabe considerar que no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso. Por esto es importante considerar algunos aspectos de la apoptosis que ocurren tanto *in vivo*, como *in vitro*, tales como el momento en el que aparece un evento determinado, la duración de los procesos relacionados, así como el proceso de eliminación de la célula apoptótica por fagocitosis. Otro factor importante es que a pesar de que se induzca apoptosis en células que se encuentran en la misma fase del ciclo celular, el proceso de muerte no es sincrónico, por lo que la búsqueda de un marcador tanto *in vivo* como *in vitro* es representativo de un momento específico.

Durante la apoptosis, ocurren cambios coordinados en el núcleo, citoplasma y la superficie celular. Una de las primeras manifestaciones morfológicas de la presencia de muerte celular por apoptosis es la pérdida de la unión celular, así como cambios en la presencia de estructuras especializadas, como lo son las microvellosidades. Al mismo tiempo se observan cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de condensación de la cromatina. Conforme el proceso avanza se puede observar la aparición de fragmentación nuclear. También se presentan cambios en el retículo endoplásmico, en donde se observan fusiones con la membrana citoplasmática.

**Figura 1.** Mecanismos de muerte celular



Fuente: Modificado de Darzynkiewicz *et al.*, 1997

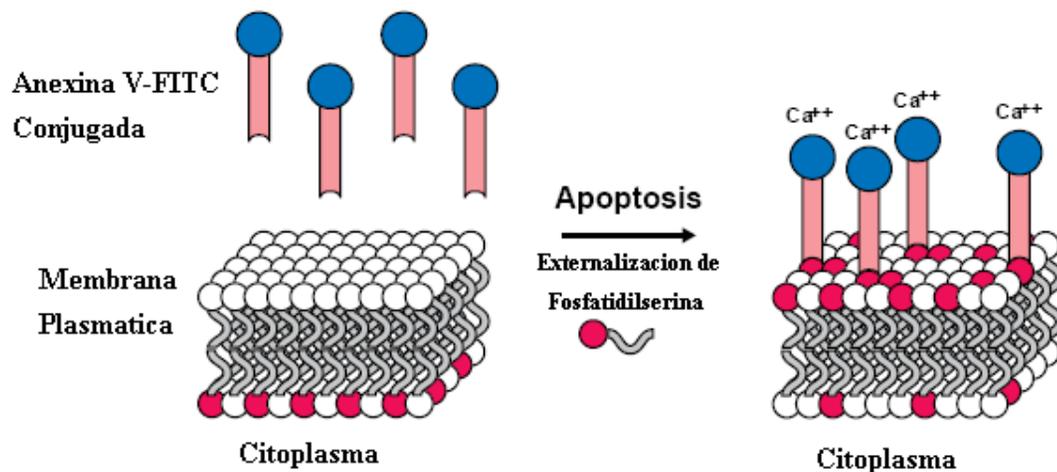
**6.5.1.1 Cambios celulares en muerte apoptótica.** Existen 5 métodos utilizados para la detección de la apoptosis: Los cambios morfológicos presentes en la muerte celular, la detección de degradación de DNA, la detección de degradación de DNA en células

individuales por medio de marcaje de DNA, la detección de la activación de caspasas y la evaluación de la asimetría de la membrana celular.

Un evento temprano presente en la apoptosis es la pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática [46]. Se conoce que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente, sin embargo se presentan cambios en su asimetría. Tal es el caso de la distribución de la fosfatidilserina (PS), la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, y cuando una célula entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana celular [46, 85]. Debido a este cambio en la asimetría se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidilserina en el exterior de la membrana celular, al agregar anexina V en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ , la cual es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, por lo que aquellas células que se encuentran marcadas con anexina V, son aquellas que se encuentran en apoptosis [85].

La detección de anexina V se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, lo cual permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido ya que marca ácido nucleicos. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o si se encuentra en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria [143].

**Figura 2.** Representación esquemática del ensayo de Anexina V



Fuente: Modificado de BD Biosciences.

Desde que la externalización de la PS ocurre en las etapas tempranas de la apoptosis, la anexina V-FITC puede identificar apoptosis en una etapa temprana basando los ensayos en

cambios nucleares como la fragmentación de DNA. La anexina V-FITC precede la pérdida de la integridad de la membrana el cual acompaña los estados tardíos de la muerte celular siendo el resultado de la apoptosis. El uso de la anexina V-FITC y el yoduro de propidio (IP) permiten la identificación de apoptosis temprana (Anexina V-FITC positivo y IP negativo: células que no absorben el colorante), la apoptosis tardía (Anexina V-FITC y IP positivo) y las células viables (Anexina V-FITC y IP negativo) [85]. Esta técnica requiere de la utilización de células íntegras, por lo que su uso se recomienda para estudios *in vitro*.

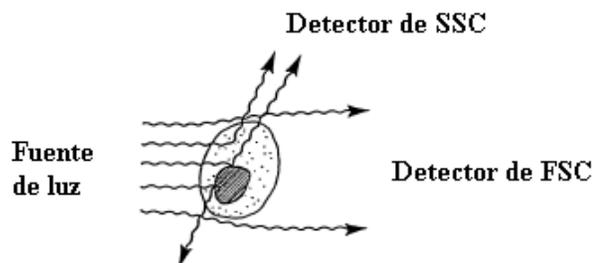
## 6.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una tecnología que mide simultáneamente y luego analiza múltiples características físicas de partículas simples, usualmente células, que se encuentran suspendidas en un fluido y que luego pasan a través de un haz de luz. Las propiedades medidas incluyen el tamaño relativo de la partícula, la granularidad relativa o complejidad interna, y la intensidad relativa de fluorescencia. Estas características son determinadas usando un sistema óptico acoplado a uno electrónico que muestra como la célula o partícula esperece la luz incidente del láser y emite fluorescencia [138].

Para la determinación de las características anteriormente mencionadas se necesita un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computador [15].

**6.6.1 Generación de dispersión y fluorescencia.** La suspensión celular es inyectada al flujo laminar, permitiendo el paso de las células una después de la otra a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser. Cuando el rayo incide en la célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula, generando información. La luz dispersada hacia delante (FSC) provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados (SSC) provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular. Si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro [138].

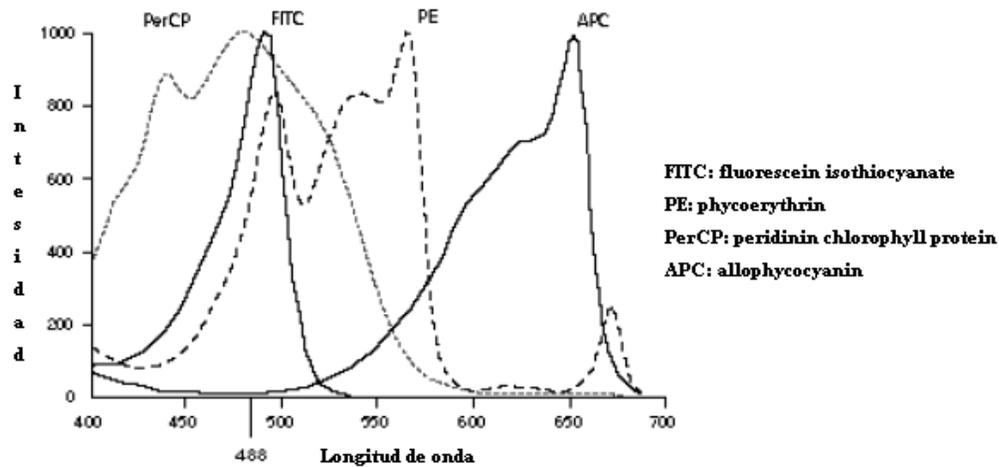
**Figura 3.** Propiedades de la dispersión de la luz de una célula



Fuente: Modificado de BD Biosciences.

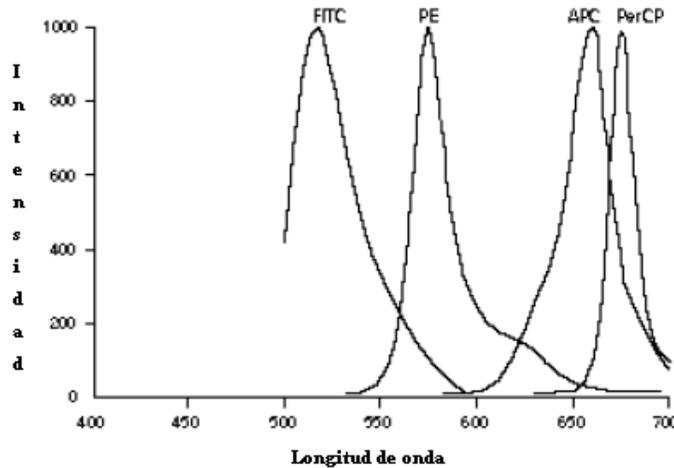
Un componente fluorescente absorbe energía de la luz en un rango de longitudes de onda características del compuesto. Esta absorción de luz provoca que un electrón en el compuesto fluorescente suba a un nivel de energía más alto. El electrón excitado decae rápidamente a su nivel de energía basal, emitiendo la energía en exceso como un fotón de luz. Esta transición de energía se conoce como fluorescencia [138].

**Figura 4.** Espectro de absorción de cuatro fluorocromos comunes



Fuente: Modificado de BD Biosciences.

**Figura 5.** Espectro de emisión de los fluorocromos mostrados en la anterior figura



Fuente: Modificado de BD Biosciences.

El rango en el que un compuesto fluorescente puede ser excitado se conoce como espectro de absorción. Cuando más energía se consume en las transiciones de absorción que se emite en las transiciones fluorescentes, las longitudes de onda emitidas serán más largas que las absorbidas. El rango de longitudes de onda emitidas para un compuesto particular

se conoce como espectro de emisión. El láser de ion de argón es usado comúnmente en citometría de flujo porque la longitud de onda de luz que emite de 488nm, excita a más de un fluorocromo. Uno de estos fluorocromos es el isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), cuyo espectro de absorción máximo esta cercano a la longitud de onda emitida por el láser de argón. Cuando un colorante fluorescente es conjugado con una molécula biológica como una proteína o un anticuerpo, este puede ser usado para identificar un tipo celular en particular, basado en la capacidad de la célula para interactuar con la molécula biológica.

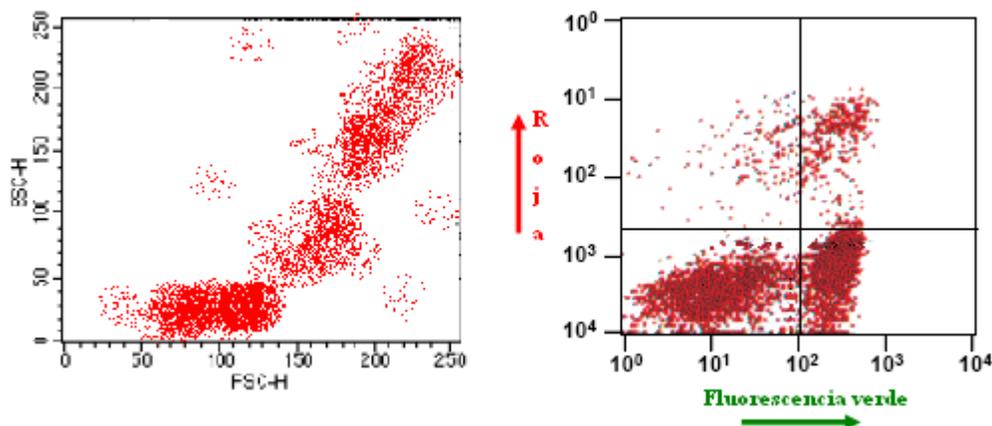
**Tabla 2.** Fluorocromos más utilizados en FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting).

Fluorocromo	Longitud de excitación	Longitud de emisión	Aplicación principal
BCECF-AM	503	528	pH intracelular
DAPI	345	455	Ácidos nucleicos
DioC6	484	501	Potencial de membrana
EGFP	489	508	Productos intracelulares
FITC	495	519	Detección de proteínas
Hoechst33342	343	483	Ácidos nucleicos
Nile red	540	610	Lípidos
PerCP	490	675	Conjugado de anticuerpos
Yoduro de propidio	536	617	Ácidos nucleicos

Fuente: <http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/multi.html>

**6.6.2 Obtención de los datos e interpretación.** El citómetro de flujo va acompañado por un computador que adquiere los datos proporcionados por el sistema eléctrico y hace una presentación gráfica. El computador produce un gráfico a partir de la luz dispersada por las células o a partir de la fluorescencia (ver figura 6).

**Figura 6.** Representaciones gráficas de los datos obtenidos en el FACS.

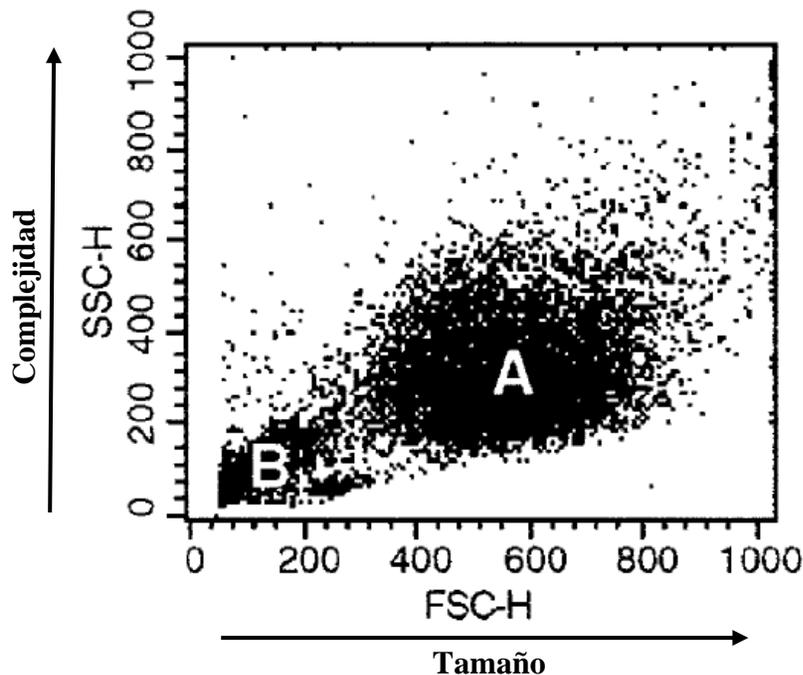


En la interpretación de estos resultados, el establecimiento de controles negativos y positivos es crítico, ya que definirán la localización de la población de interés. Por ejemplo,

si se quiere distinguir una población de células positiva para cierta fluorescencia, el límite mínimo del área de interés deberá definirse de manera que incluya únicamente a ese tipo de células. Para lograr esto, es necesario tener un control positivo que sirva como base para la definición del área positiva. Si el límite mínimo se establece cerca de la zona donde se encuentran las células negativas, la frecuencia de las positivas podría sobreestimarse o subestimarse dependiendo de la señal de fondo que den los marcadores.

**6.6.3 Propiedades de dispersión de la luz de las células muertas.** El análisis de la dispersión de la luz brinda información acerca del tamaño y estructura celular. La intensidad de la luz dispersada hacia delante se correlaciona con el tamaño celular y la intensidad de la luz dispersada hacia los lados da información sobre la granularidad y la presencia de estructuras intracelulares que pueden reflejar luz [139]. Se espera que la habilidad de dispersión de la luz de las células se vea alterada durante la muerte celular, reflejando cambios morfológicos como hinchazón o encogimiento celular, ruptura de la membrana plasmática, y en el caso de apoptosis, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

**Figura 7.** Análisis mediante citometría de flujo de las características morfológicas de las células muertas. Los linfocitos en proceso de muerte celular generan una población celular con disminución del FSC y SSC en comparación con los linfocitos viables. Población A: Linfocitos viables, población B: linfocitos muertos.



Modificado de Carbonari, *et al.*, 1997

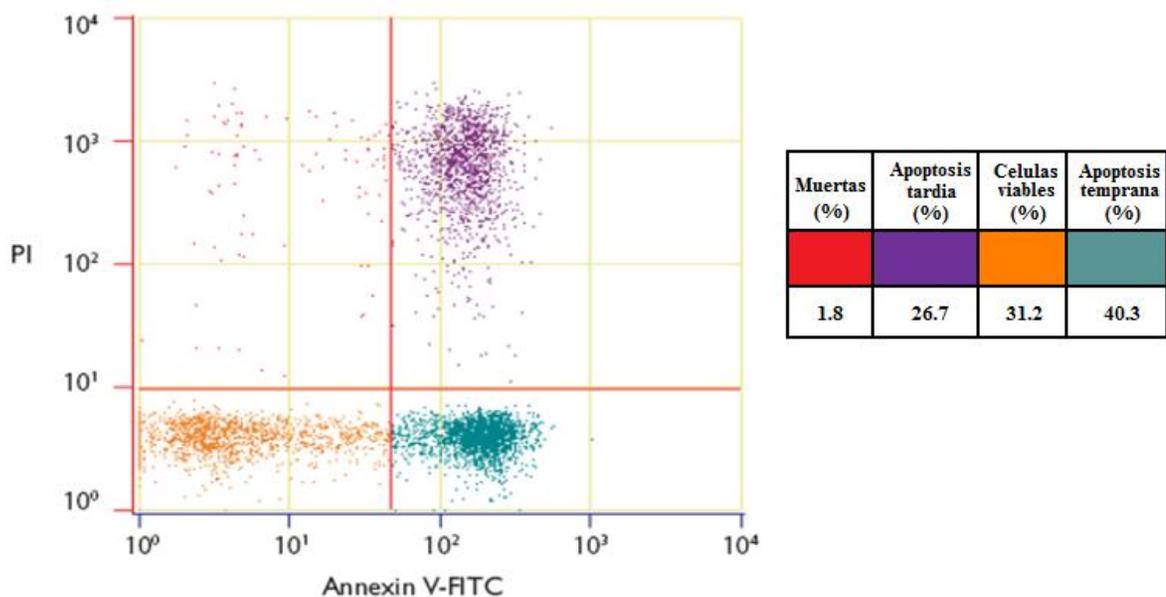
La necrosis celular está asociada con un incremento inicial y luego una rápida disminución de la habilidad de la célula para dispersar la luz tanto hacia delante como a los lados

(disminución de FSC y SSC respectivamente). Esto se relaciona con una hinchazón inicial de las células, seguida por la ruptura de la membrana plasmática y el esparcimiento de los constituyentes celulares. Por el contrario, durante la apoptosis, se presenta la disminución de la dispersión de la luz hacia delante como resultado del encogimiento celular sin una disminución de la luz dispersada hacia los lados, lo que puede reflejar un incremento de la luz dispersada por la cromatina condensada y la fragmentación del núcleo. Sin embargo, en etapas tardías de la apoptosis, la intensidad de la luz dispersada tanto hacia delante como a los lados se ve disminuida [121, 151] (Figura 7).

**6.6.4 Anexina V y citometría de flujo.** La anexina V-FITC es usada para la cuantificación del porcentaje de células en el proceso apoptótico. Se basa en la propiedad que tienen las células de perder la asimetría de la membrana celular en las etapas tempranas de la apoptosis. En estas células, el fosfolípido de membrana, fosfatidilserina (PS) es translocada de la cara interna de la membrana a la cara externa de la misma.

El yoduro de propidio (PI) es un colorante utilizado frecuentemente en citometría de flujo y permite distinguir entre células viables y no viables. Las células viables, con membrana intacta, excluyen el PI, mientras que las membranas de células muertas o de células dañadas, son permeables para el PI. Las células que se tiñen positivas para Anexina V-FITC y negativas para PI, están en etapas tempranas de apoptosis. Las células que se tiñen positivas para ambos colorantes están en etapas tardías de apoptosis, son necróticas o muertas. Las células negativas para ambos colorantes son viables y no están en proceso apoptótico [85] (Figura 8).

**Figura 8.** Análisis mediante citometría de flujo de células apoptóticas utilizando Anexina V-FITC



Modificado de: BD. Biosciences, annexin V kit

**6.6.5 Aplicaciones e importancia.** En general, el citómetro de flujo (FACS) se utiliza para analizar y separar células según características definidas como los linfocitos. En los últimos tiempos el FACS se ha convertido en una herramienta importante en la farmacología, toxicología, bacteriología, virología, ciencias ambientales y en el monitoreo de bioprocesos, debido a que a través de la dispersión de la luz, la fluorescencia y la absorbancia de las células teñidas o no teñidas, se pueden medir un gran número de parámetros celulares [138].

De 1968 (nacimiento del FACS) a la fecha, el FACS ha crecido como instrumento y como método gracias al impulso que han dado los usuarios de esta tecnología. Este aparato, que medía sólo tres parámetros y era usado sólo en la inmunología, ahora ha llegado a niveles de complejidad que parecen difíciles de superar, ya que pueden medirse hasta 13 parámetros diferentes y ha encontrado aplicaciones en casi todas las áreas de la biotecnología. De hecho, las nuevas aplicaciones están limitadas por el desarrollo de nuevos anticuerpos, fluoróforos y sustratos fluorescentes que permitan detectar nuevos componentes celulares.

## 7. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La sustancia evaluada en este estudio fue el tñner 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 25mm), se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente hermético de vidrio para evitar su volatilización.

### 7.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio es de tipo experimental *in vitro*. Se emplearon linfocitos humanos de sangre periférica aislados los cuales fueron tratados con tñner a diferentes concentraciones (alta, media, baja) con su respectivo control negativo (dimetilsulfóxido) y positivo (peróxido de hidrogeno), y se evaluó el efecto apoptótico mediante el marcaje con anexina V – FITC y yoduro de propidio por citometría de flujo. Se llevó a cabo este tipo de diseño debido a que se tiene control sobre la asignación de los tratamientos mediante un proceso aleatorio y porque es posible prevenir la introducción de sesgos y lograr altos índices de validez. Se realizó un diseño de bloques aleatorizados, agrupando las unidades experimentales en bloques y determinando la distribución de los tratamientos en cada uno. Se estableció al cultivo celular como unidad de análisis experimental y de muestreo.

### 7.2 SELECCIÓN DE CONTROLES

Debido a la baja hidrosolubilidad que presenta el tñner, se hace necesario utilizar un cosolvente para lograr la dilución del mismo, por lo que se uso el dimetilsulfóxido, DMSO (D-8779 sigma) como su vehículo. La presencia del DMSO en los cultivos fue del 1% ya que estudios publicados indican que a esta concentración no se presentan modificaciones en la integridad de las membranas celulares [131, 101]. Por esta razón el DMSO fue utilizado como control negativo de los experimentos realizados.

Se conoce que el peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (No. CAS: 7722-84-1) tiene la capacidad de inducir muerte celular tanto apoptótica como necrótica [89]. Es importante considerar que la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> influye en el tipo de muerte celular; a una baja concentración (40  $\mu$ M) se presenta bajo porcentaje de apoptosis y de necrosis, a una concentración media (80  $\mu$ M) se incrementa tanto la apoptosis como la necrosis y a altas concentraciones (>176  $\mu$ M) hay mayor necrosis que apoptosis [146]; debido a lo anterior, se tomó a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40  $\mu$ M como la concentración ideal para el control positivo. Además, diversos estudios muestran que la capacidad de inducir apoptosis del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es solo atribuible a la concentración a la que este se encuentre sino también al tiempo de tratamiento [164].

### **7.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Para cada experimento: prueba de índice mitótico, cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento y prueba de apoptosis, se realizó el aislamiento de linfocitos. La muestra de sangre fue tomada del antebrazo de una persona de sexo masculino saludable de 21 años de edad, que no consumía bebidas alcohólicas, cigarrillo o sustancias psicoactivas ni sustancias químicas específicas, durante los cuatro meses previos a la toma de muestras con el fin de disminuir posibles sesgos en los resultados.

Se realizó el aislamiento de células mononucleares de sangre total mediante gradiente de densidad con Ficoll-hipaque, histopaque (1077-1 Sigma). Para la muestra de sangre se tomaron de 20 – 21 mL de histopaque y se depositaron en tubos de centrifuga de 50 ml, se le agregó igual cantidad de sangre y se centrifugó a 2600 r.p.m. por 30 minutos. Con una pipeta se removieron las células mononucleadas y posteriormente se realizaron dos lavados con Buffer Salino Fosfato estéril, PBS (P-3813-10 Sigma) libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , centrifugando a 2600 r.p.m. por 15 minutos.

### **7.4 CONTEO CELULAR**

Para establecer el número de células mononucleares vivas en el volumen obtenido y así cultivar el volumen de células requeridas para cada cultivo, se realizó el conteo celular mediante la prueba de exclusión del azul de tripano, el cual se basa en que las células vivas no absorben este colorante y por el contrario las células no viables si lo ingieren debido a que la membrana pierde su integridad y funcionalidad.

Se tomaron 30 $\mu\text{L}$  del azul de tripano (T-6146 Sigma) en un tubo plástico, se agregaron 30 $\mu\text{L}$  de células mononucleares previamente aisladas y se mezclaron bien. Se cargó la cámara del hemocitómetro con pipeta pasteur y en un microscopio (Nikon), con el objetivo de 40X y ocular 10X se realizó el conteo de las células en cada uno de los 25 cuadrantes. Las células vivas lucieron transparentes y las células muertas tomaron el color azul. Para calcular el número de células/mL se multiplicó el número de células mononucleares en el cuadrado del hemocitómetro por 10000 y para calcular el porcentaje de células vivas se dividió el número de células no coloreadas (vivas) sobre la sumatoria de células no coloreadas (vivas) y coloreadas (muertas), y se multiplicó finalmente este resultado por 100.

### **7.5 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Normalmente los linfocitos se encuentran en un estado G0 o de no división celular. Los linfocitos son inducidos a entrar en el ciclo de división celular por medio del estímulo con fitohemaglutinina, presentando en promedio un ciclo celular de 24 horas, por lo que después de ese tiempo se procede a tratarlos con las diferentes concentraciones del químico, para que mediante la maquinaria de la fase de síntesis, los daños ocasionados en el ADN, se vean reflejados como rupturas de cadena doble.

En tubos eppendorf estériles de 2 mL, con tapa rosca y cierre hermético, se realizó el cultivo de células mononucleares bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar; cada tubo de cultivo contenía medio RPMI 1640 completo, así: medio RPMI 1640 simple pH  $7.2 \pm 0.2$  (R-8758 Sigma), suero bovino fetal (16000-044 Invitrogen) 10%, penicilina-streptomina (A-5955 Sigma) al 1%, L-glutamina (G-3126 Sigma) 1% del volumen final (concentración final en el cultivo 2mM); y se agregaron posteriormente las células mononucleares aisladas ( $1.2 \times 10^6$  células para la prueba de índice mitótico, y 300.000 células para las pruebas de cinética de muerte celular en función del tiempo y apoptosis) y fitohemaglutinina (L-8754 Sigma) (2% del volumen final) a cada tubo de cultivo.

## **7.6 TRATAMIENTOS**

Las soluciones Stock de cada concentración experimental, fueron preparadas justo antes de aplicarse a los cultivos. Los tratamientos fueron aplicados en cámara de flujo laminar en condiciones de esterilidad 24 horas después de haber sido establecido el cultivo, tanto para la prueba de índice mitótico (volumen de 13  $\mu\text{L}$  por cultivo) como para las pruebas de viabilidad celular, cinética de muerte celular en función del tiempo y de apoptosis temprana (volumen 5  $\mu\text{L}$  por cultivo). Para la preparación de las concentraciones experimentales de tiner se realizaron las diluciones en DMSO y cada uno de los tratamientos tuvo un volumen final en el cultivo del 1% de DMSO. Para la determinación del rango de concentraciones de tiner a utilizar, se tomó como base los ensayos realizados por Hidalgo y Londoño en linfocitos de sangre total [64], quienes utilizaron un rango de concentraciones finales en cultivo de 0,025-1,200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ . En este estudio se utilizaron rangos de concentración del tiner de 0,05-1,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$ , para linfocitos humanos aislados.

## **7.7 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD**

### **7.7.1 PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO**

Para la prueba de citotoxicidad, se establecieron los cultivos celulares en las condiciones antes mencionadas, en tubos de tapa rosca (2mL) a un volumen final de 1.3 mL y se colocaron a incubar por 48 horas a 37°C. Transcurridas 24 horas de iniciado el cultivo se aplicaron los diferentes tratamientos, el grupo control positivo (peróxido de hidrógeno, a una concentración de 40 $\mu\text{M}$ ), el control negativo (dimetilsulfóxido) y para el grupo experimental ocho concentraciones de tiner (1.00, 0.80, 0.60, 0.40, 0.30, 0.20, 0.10, 0.05  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Se trataron de la siguiente manera: 1000 a 1066 $\mu\text{L}$  de medio, 200-210 $\mu\text{L}$  de suspensión celular ( $1.2 \times 10^6$  células/mL) mas 13 $\mu\text{L}$  de tratamiento. Transcurridas 46 horas de iniciado el cultivo, se adicionó colcemid y a las 48 horas se realizó el lavado y cosecha de las células [69]. Luego se realizaron las preparaciones citogenéticas para la prueba de índice mitótico (IM) con el fin de evaluar citotoxicidad y determinar las concentraciones baja, media y alta (0,10; 0,20 y 0,40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  respectivamente) para la evaluación de la apoptosis.

**7.7.1.1 Cosecha del cultivo celular.** Protocolo modificado de Henegariu, *et al.*, [62]. Después de haber transcurrido las 48 horas de iniciado el cultivo de células mononucleares aisladas para IM se procedió a realizar la cosecha.

Se centrifugó el cultivo celular a 1000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se adicionó solución hipotónica (KCl 0,075M) y se incubó de 10 a 20 minutos a 37 °C. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, se desechó sobrenadante; posteriormente se realizaron 3 fijaciones con Carnoy's (metanol: ácido acético, 3:1) y se centrifugó a 3500 r.p.m. de 1 a 2 minutos. Después de la tercera fijación se descartó sobrenadante y se gotearon las placas para el extendido celular. El goteo se realizó en portaobjetos limpios colocados a vapor de agua en baño María. Se colocó una suspensión celular de 25 a 35  $\mu$ L y de 1 a 3 segundos se sometieron a vapor de agua. Posteriormente, se colocaron a secar en la plancha a 65°C y después de haber transcurrido 3 días, se procedió a la tinción con Giemsa al 10%.

El IM se calculó mediante la proporción de células en metafase, en un mínimo de 4000 células/concentración. Se realizaron 6 repeticiones de cada experimento y para cada repetición se establecieron dos cultivos por concentración (incluidos el control positivo y negativo), de cada cultivo se obtuvieron 2 preparaciones citogenéticas. Las preparaciones se analizaron al microscopio óptico con objetivo de 40X. De cada preparación se analizaron 1000 células. En este estudio el dato se expresó como el número de metafases registradas en un mínimo de 4000 células (no. Metafases/4000 células). En total, se analizaron 24000 células por tratamiento.

**Figura 9.** Protocolo de siembra de linfocitos aislados para la prueba de índice mitótico



**7.7.1.2 Selección de tratamientos experimentales.** La selección de los tratamientos experimentales para la evaluación del efecto apoptótico del tiner en los linfocitos humanos se basó en los siguientes criterios. Se selecciono como concentración baja (0.10  $\mu$ L/mL), aquella que no induce una disminución significativa respecto al control negativo; como concentración media (0.20  $\mu$ L/mL), la concentración que induce una disminución del IM en un 50% respecto al control negativo y como concentración alta (0.40  $\mu$ L/mL), la concentración que representa un 20% del IM encontrado en el control negativo [69].

## 7.8 CINÉTICA DE MUERTE CELULAR EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO

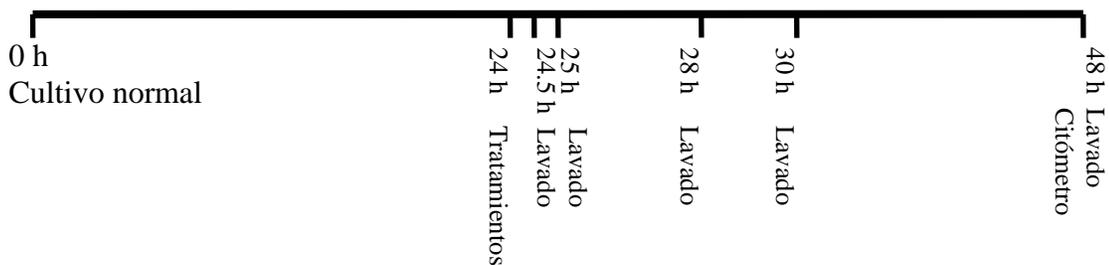
Se realizó el aislamiento y establecimiento de los cultivos de células mononucleares como se mencionó anteriormente con un volumen final de 500  $\mu$ L, ya que para esta prueba se

necesita una menor cantidad de células para realizar el análisis: 300 a 315µL de medio, 180 a 190µL de suspensión celular ( $3 \times 10^5$  células/mL) mas 5µL de tratamiento.

Transcurridas 24 horas de iniciado el cultivo, se aplicaron los 3 tratamientos de tiner (concentración alta, media y baja) y dos controles (positivo y negativo), estableciendo dos cultivos por tratamiento, y se realizaron los respectivos lavados de los diferentes cultivos tras 0.5, 1, 4, 6 y 24 horas de tratamiento. El lavado de los tratamientos se realizó centrifugando a 1600 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió con PBS, se centrifugó nuevamente a 1600 rpm durante 5 minutos y sin retirar el sobrenadante se centrifugó a 1600 rpm durante 2 minutos. Los botones celulares se depositaron en tubos de citometría de flujo que contenían 400 µL de PBS + paraformaldehído 1% frío y posteriormente, se realizó la lectura en el citómetro de flujo de 10000 eventos por cultivo. Se realizaron 7 repeticiones de cada experimento, por cada tiempo de tratamiento se realizaron dos cultivos por concentración (incluidos el control positivo y negativo), para un total de 14 cultivos y 140000 células analizadas por concentración.

Para la determinación de la cinética de muerte celular en función del tiempo se tuvieron en cuenta las características de dispersión de la luz de las células que se encuentran en procesos de muerte celular. La adquisición de datos se hizo mediante el Software CellQuest. El análisis de las imágenes obtenidas en el citómetro se realizó con ayuda del Software WinMDI versión 2.8.

**Figura 10.** Protocolo de siembra de linfocitos aislados para la determinación de la cinética de muerte celular.



### 7.9 PRUEBA DE APOPTÓISIS MEDIANTE MARCAJE CON ANNEXINA V-FITC Y YODURO DE PROPIDIO (IP)

Para la evaluación del efecto apoptótico, se realizó primero el aislamiento de células mononucleares, el conteo celular y posteriormente se establecieron los cultivos celulares como se mencionó anteriormente, a un volumen final de 500 µL: 300 a 315µL de medio, 180 a 190µL de suspensión celular ( $3 \times 10^5$  células/mL) mas 5µL de tratamiento. Se aplicaron los tratamientos a las 24 horas de iniciado el cultivo (fase S del ciclo celular). Se realizaron dos cultivos de linfocitos aislados por tratamientos, control positivo, control

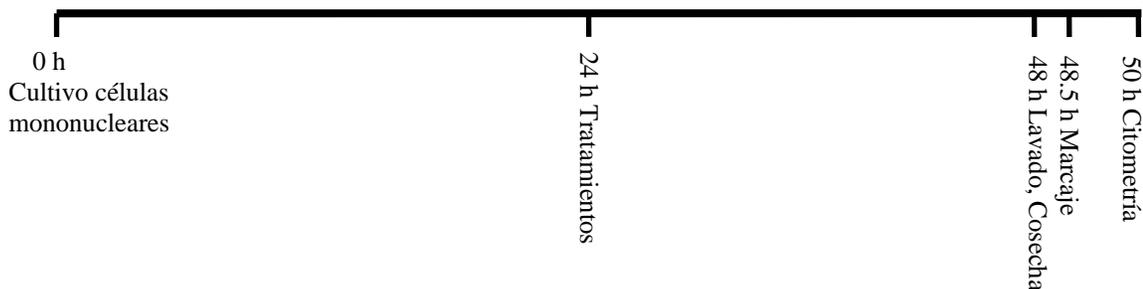
negativo y grupo experimental (baja, media, alta). Se realizaron tres lavados con PBS estéril de la suspensión celular con el fin de retirar los tratamientos y se procedió al marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio (annexin V-FITC apoptosis detection Kit II) para la evaluación de células apoptóticas. Se analizaron por citometría de flujo 10000 eventos por cultivo para un total de 20000 eventos por concentración en cada uno de los experimentos.

Luego de realizar la cosecha celular se resuspendieron las células en buffer de unión 1X a una concentración de  $1.2 \times 10^6$  células/mL. Se transfirieron 100 $\mu$ L de la solución ( $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  células) a un tubo de citometría de 5mL. Posteriormente se adicionaron en oscuridad, 3 $\mu$ L de anexina V-FITC y 3 $\mu$ L de yoduro de propidio (IP). Las células se mezclaron bien utilizando vortex y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se adicionaron 400 $\mu$ L de buffer de unión a cada tubo, obteniendo 500 $\mu$ L de suspensión celular, y se analizaron por citometría de flujo en un periodo de tiempo máximo de una hora.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA) equipado con un láser de argón de 488nm 15 mW. Según los datos arrojados por tamaño y complejidad de las células mononucleares a estudiar se realizó la separación de la población de linfocitos humanos. La adquisición de datos ( $10^4$  eventos por cada muestra) se hizo utilizando el Software CellQuest. El análisis de los datos se realizó con el Software WinMDI. La fluorescencia verde (FL1) fue colectada por medio de un filtro 530/30. La fluorescencia roja (FL2) fue colectada por medio de un filtro 585/42. El voltaje del fotomultiplicador (hecho de modo lineal para la dispersión de la luz y en un modo logarítmico con estos voltajes típicos FL1=600, FL2=550) y la compensación de la fluorescencia (FL1= Anexina V-FITC, FL2= PI) fueron realizadas paso a paso, analizando las células individualmente para optimizar los resultados de las muestras.

Las células viables fueron negativas tanto para la anexina V-FITC como para el yoduro de propidio (IP), las células en apoptosis temprana fueron positivas para anexina V-FITC y negativas para IP y las células en apoptosis tardía o necróticas positivas para anexina V-FITC e IP.

**Figura 11.** Protocolo de siembra para la evaluación de apoptosis mediante citometría de flujo.



**Cuadro 1.** Diseño experimental prueba citotoxicidad mediante índice mitótico

PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO (IM)								
Grupos	Tratamientos	Concentración Final en el cultivo ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Vol. Ttos. ( $\mu\text{L}$ )	No. De cultivos por experimento	No. placas por cultivo	Células analizadas por tratamiento	No. de experimentos	Análisis Estadístico
Control negativo	DMSO	1%	13	2	2	4000	6	<ul style="list-style-type: none"><li>• Distribución normal de datos (Shapiro-Wilk).</li><li>• Homogeneidad de varianzas (Levene)</li><li>• Paramétrico: ANOVA univariada</li><li>• Correlación: Pearson</li></ul>
Experimental	Tíner	0.05	13	2	2	4000	6	
		0.10	13	2	2	4000	6	
		0.20	13	2	2	4000	6	
		0.40	13	2	2	4000	6	
		0.60	13	2	2	4000	6	
		0.80	13	2	2	4000	6	
		1.00	13	2	2	4000	6	
Control positivo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4 $\mu\text{M}$	13	2	2	4000	6	

**Cuadro 2.** Diseño experimental prueba cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento

CINÉTICA DE MUERTE CELULAR								
Tiempo de tratamiento (horas)	Grupos	Tratamiento	Concentración Final en el cultivo ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Volumen Tto. ( $\mu\text{L}$ )	No. Cultivos por Tto.	N° células analizadas por cultivo	Repeticiones del experimento	Análisis Estadístico
0.5	C. Negativo	DMSO	1 %	5	2	10000	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribución normal de datos (Shapiro-Wilk).</li> <li>• Homogeneidad de varianzas (Levene)</li> <li>• No paramétrico: Kruskal-Wallis</li> </ul>
	Experimental	Tíner	Baja (0,10)					
			Media (0,20)					
			Alta (0,40)					
C. Positivo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4 $\mu\text{M}$						
1	C. Negativo	DMSO	1 %	5	2	10000	7	
	Experimental	Tíner	Baja (0,10)					
			Media (0,20)					
			Alta (0,40)					
C. Positivo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4 $\mu\text{M}$						
4	C. Negativo	DMSO	1 %	5	2	10000	7	
	Experimental	Tíner	Baja (0,10)					
			Media (0,20)					
			Alta (0,40)					
C. Positivo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4 $\mu\text{M}$						
6	C. Negativo	DMSO	1 %	5	2	10000	7	
	Experimental	Tíner	Baja (0,10)					
			Media (0,20)					
			Alta (0,40)					
C. Positivo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4 $\mu\text{M}$						
24	C. Negativo	DMSO	1 %	5	2	10000	7	
	Experimental	Tíner	Baja (0,10)					
			Media (0,20)					
			Alta (0,40)					
C. Positivo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4 $\mu\text{M}$						

C. Negativo: Control negativo; C. Positivo: Control positivo

**Cuadro 3.** Diseño experimental prueba de apoptosis

PRUEBA DE APOPTÓISIS Y PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR							
Grupos	Tto	Concentración Final en el cultivo ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Vol. Tto. ( $\mu\text{L}$ )	No. Cultivos	Nº células Analizadas por cultivo	Número de experimentos	Análisis Estadístico
Control negativo	DMSO	1%	5	2	10.000	5	Paramétrico: anova multivariada.  No paramétrico: Kruskal-Wallis y Spearman
Experimental	Tíner	Baja (0,10)	5	2	10.000	5	
		Media (0,20)	5	2	10.000	5	
		Alta (0,40)	5	2	10.000	5	
Control positivo	$\text{H}_2\text{O}_2$	0.4 $\mu\text{M}$	5	2	10.000	5	

Tto: tratamiento

## 7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**Cuadro 4.** Descripción de las variables

Variables		Tipo de variable	Naturaleza	Nivel de medición	
Tratamiento	DMSO		Independiente	Cuantitativa	Nominal
	Tíner	5 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		10 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		20 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		30 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		40 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		60 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		80 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
		100 $\mu\text{L}/\text{mL}$			
$\text{H}_2\text{O}_2$ (40 $\mu\text{M}$ )					
Tiempo de tratamiento		Independiente	Cuantitativa	Razón	
Índice Mitótico		Dependiente	Cuantitativa	Razón	
Viabilidad Celular		Dependiente	Cuantitativa	Razón	
Apoptosis		Dependiente	Cuantitativa	Razón	

Para el análisis estadístico, los resultados obtenidos se sometieron a pruebas de estadística descriptiva como la distribución normal de los datos (Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de varianzas (Levene) e independencia de datos, donde se tuvo en cuenta medidas de tendencia central (promedio, mediana y moda) y de variabilidad (desviación estándar y varianza). Estas pruebas son necesarias para determinar el tipo de pruebas estadísticas a emplear.

Los resultados de la prueba de índice mitótico y de apoptosis, indicaron que los datos se ajustan significativamente a una distribución normal, por lo que se asumió una prueba paramétrica, como la más adecuada para su utilización en el análisis de estos datos.

Finalmente, se usó la prueba de correlación de Pearson para determinar si existe algún tipo de asociación entre el índice mitótico 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 de la prueba de cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento y de viabilidad celular, los datos se apartaron significativamente de una distribución normal, por lo que se asumieron pruebas no paramétricas para el análisis.

Todos los datos obtenidos en las pruebas de índice mitótico, cinética de muerte celular, viabilidad celular y apoptosis, se analizaron usando las funciones estadísticas y gráficas del paquete estadístico SPSS versión 13.0 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences), con un nivel máximo de significancia de 0,05.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 ENSAYOS PRELIMINARES Y COMPENSACIÓN

Para la determinación del rango de concentraciones de tiner a utilizar, se tomó como base los ensayos realizados por Hidalgo y Londoño en linfocitos de sangre total [65], quienes utilizaron un rango de concentraciones finales en cultivo de 0,025-1,200 $\mu$ L/mL, y evaluaron la citotoxicidad mediante la prueba de exclusión con azul de tripano. En este estudio se utilizaron rangos de concentración del tiner de 0,05-1,00 $\mu$ L/mL, ya que los linfocitos humanos aislados son más susceptibles a la acción de los químicos. La citotoxicidad fue evaluada mediante la prueba de índice mitótico, estableciendo ensayos preliminares para el correcto funcionamiento de la prueba (2 experimentos preliminares).

También se establecieron pruebas preliminares de la prueba de cinética de muerte celular en función del tiempo de tratamiento, para comprobar el óptimo funcionamiento del equipo y el buen estado de los reactivos, lo que sirvió además para corregir problemas técnicos y de manipulación durante el establecimiento de las pruebas, tales como, la correcta separación de la población de interés, en este caso lo linfocitos humanos, ajuste de los voltajes de adquisición, apropiado funcionamiento mecánico del citómetro de flujo y adquirir destreza en el manejo del software de adquisición y análisis de los datos arrojados por el citómetro (2 experimentos preliminares).

Para la prueba de apoptosis temprana mediante coloración con anexina V-FITC y yoduro de propidio, se realizó la compensación del citómetro de flujo cada semana, antes de realizar el análisis de los linfocitos, con el fin de optimizar la adquisición de datos provenientes de los fluorocromos. De igual forma se hizo el ajuste de los voltajes de adquisición de las fluorescencias con el fin de evitar solapamientos en las poblaciones de linfocitos marcadas con los dos fluorocromos (2 experimentos preliminares).

### 8.2 EFECTO CITOTÓXICO

#### 8.2.1 Índice mitótico

En la tabla 3 se reporta el registro del IM de linfocitos humanos aislados tratados *in vitro* durante 24 horas con diferentes concentraciones de tiner, al analizar 4000 células por tratamiento. El índice mitótico (IM) obtenido para las diferentes concentraciones de tiner, se ajusta a la distribución normal (según prueba de normalidad de Shapiro-Wilk,  $P > 0.05$ ), por lo que se procedió a emplear pruebas de significancia estadística de carácter paramétrico. Mediante la prueba comparaciones múltiples T3 de Dunnet, para varianzas no homogéneas, se logró establecer que el efecto de la concentración 0,80  $\mu$ L/mL, es tan drástico en la depresión del IM, que difiere significativamente del resto de las concentraciones, mientras que con la concentración más alta (1,00  $\mu$ L/mL) no hubo

proliferación celular; por otra parte, las concentraciones más bajas del tiner (0,05  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 0,10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) no presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo.

**Tabla 3.** Índice mitótico de linfocitos humanos aislados tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de tiner durante 24 horas.

Concentración $\mu\text{L}/\text{mL}$	Índice mitótico						$\bar{X} \pm \text{EE}^*$
	Repeticiones						
	1	2	3	4	5	6	
0,00	2,600	2,550	2,575	2,650	2,550	2,600	2,587 $\pm$ 0,030
0,05	2,550	2,525	2,500	2,300	2,450	2,350	2,445 $\pm$ 0,049
0,10	2,250	2,000	2,275	2,250	2,000	2,000	2,129 $\pm$ 0,050
0,20	1,025	1,125	1,025	1,450	1,125	1,100	1,141 $\pm$ 0,054 <sup>a</sup>
0,40	0,775	0,825	0,750	0,700	0,775	0,750	0,770 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>
0,60	0,325	0,250	0,275	0,250	0,300	0,275	0,279 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>
0,80	0,050	0,100	0,150	0,050	0,075	0,100	0,087 $\pm$ 0,010 <sup>a,b</sup>
1,00	0	0	0	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>

\*Índice mitótico promedio  $\pm$  error estándar, al analizar 24000 células por concentración

<sup>a</sup> Tratamientos que difieren significativamente del control negativo, según prueba T3 de Dunnet ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Tratamientos con los valores más bajos de IM que difieren significativamente del control negativo, según prueba T3 de Dunnet ( $P < 0.05$ ).

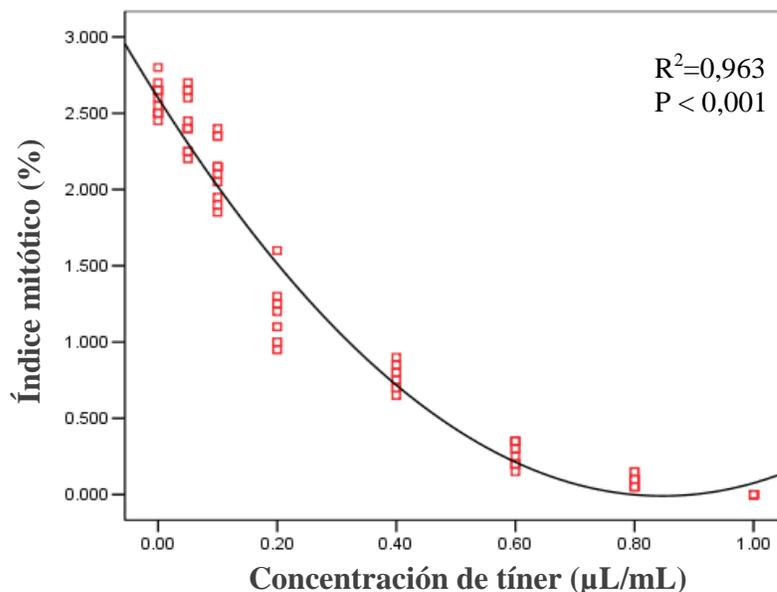
<sup>c</sup> No hubo proliferación celular

Mediante el análisis de correlación de Pearson ( $R = -0,926$ ,  $P < 0.01$ ) se evidencia una asociación negativa estadísticamente significativa entre las concentraciones del tiner (0,10 – 1,00  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y el índice mitótico, indicando una disminución en el número de células en mitosis al aumentar la concentración del tiner en un periodo de tratamiento de 24 horas (relación concentración-efecto). Por otra parte, al realizar el análisis de regresión simple, se observa una aproximación curvilínea cuadrática, con un coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,963$ ), infiriéndose que el 96,3 % de la variación en el índice mitótico puede explicarse mediante la variabilidad en la concentración del tiner (figura 12), subsistiendo un 3,7 % de variabilidad no explicada, debida posiblemente a factores no incluidos en el modelo de regresión, tales como manipulación, reactivos y variación en la temperatura.

La ecuación cuadrática [ $y = b_0 + (b_1 * x) + (b_2 * x^2)$ ] que describe la relación entre el índice mitótico y la concentración del tiner es la siguiente:

$$\text{Índice mitótico} = 2,601 - (6,163 * \text{concentración tiner } \mu\text{L}/\text{mL}) + (3,638 * (\text{concentración tiner } \mu\text{L}/\text{mL})^2)$$

**Figura 12.** Asociación cuadrática negativa entre el IM de linfocitos humanos aislados tratados *in vitro* y las diferentes concentraciones de tiner durante 24 horas.



Mediante el análisis de varianza (ANOVA), se identificó una diferencia significativa estadísticamente entre las diferentes concentraciones del tiner ( $P < 0.001$ ). Los índices mitóticos más altos se presentaron en el control negativo ( $2,587 \pm 0,030$ ) y en las concentraciones de 0,05 y 0,10  $\mu\text{L/mL}$  ( $2,445 \pm 0,049$  y  $2,129 \pm 0,050$  respectivamente) y los porcentajes más bajos en las concentraciones de 0,80 y 1,00  $\mu\text{L/mL}$  ( $0,087 \pm 0,010$  y  $0,0 \pm 0,0$  respectivamente).

La concentración que disminuyó al IM en un 50% fue 0,20  $\mu\text{L/mL}$  y la que disminuyó al IM en aproximadamente un 30 % fue 0,40  $\mu\text{L/mL}$ . De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba, se realizó la selección de las concentraciones empleadas para evaluar el efecto apoptótico *in vitro* de los linfocitos humanos tratados con tiner. Por lo tanto, las concentraciones del solvente orgánico seleccionadas como baja, media y alta para la prueba de apoptosis fueron 0,10; 0,20 y 0,40  $\mu\text{L/mL}$ , respectivamente.

### 8.3 CINÉTICA DE MUERTE CELULAR EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En el cuadro 5 se muestran los valores promedio de muerte celular de linfocitos humanos aislados, tratados *in vitro* con DMSO (control negativo), las concentraciones baja, media y alta de tiner (0,10; 0,20; 0,40  $\mu\text{L/mL}$  respectivamente) y peróxido de hidrogeno (control positivo) durante 0,5; 1; 4; 6 y 24 horas. Debido a que los datos no cumplen con el supuesto de normalidad e igualdad de varianzas, se analizaron mediante pruebas no paramétricas con un nivel máximo de significancia de  $P=0.05$ , complementado con una prueba de comparaciones múltiples para varianzas desiguales (T3 de Dunnet).

Mediante el análisis de Kruskal-Wallis se evidenció una diferencia significativa estadísticamente ( $X^2= 99.929$ ;  $P< 0.0001$ ) en el porcentaje de muerte celular de los linfocitos humanos aislados, tratados con tiner. De igual manera se observa una diferencia significativa estadísticamente ( $X^2= 100.845$ ;  $P<0.0001$ ) en el porcentaje de muerte celular a diferentes tiempos de tratamiento. Por lo anterior se deduce que la concentración del tiner y el tiempo de tratamiento influyen en la variabilidad del porcentaje de muerte celular.

Para saber si existe una interacción entre las concentraciones del tiner y el tiempo de tratamiento, se determinó el efecto combinado de las dos variables en la inducción de muerte celular, encontrándose que la concentración de tiner influye en la variabilidad del porcentaje de muerte celular, aumentando, dependiendo del tiempo de tratamiento ( $X^2=214.537$ ;  $P<0.0001$ ).

Al tratar los linfocitos con las diferentes concentraciones del tiner, el control positivo y el control negativo durante 0,5; 1; 4; 6 y 24 horas, se observó la formación de dos poblaciones de linfocitos: La población A, en la que se encuentran los linfocitos viables y la población B con células que presentaron una disminución del tamaño (disminución de FSC) y de la granularidad celular (disminución de SSC), característico del proceso de muerte celular. A medida que el tiempo de tratamiento y la concentración del tiner aumentan, se presenta una disminución en la proporción de células de la población A, mientras que la proporción de células en la población B aumenta (Figura 13).

Mediante el análisis de comparaciones múltiples T3 de Dunnet se estableció que después de 0,5 horas de tratamiento, solamente el control positivo ( $H_2O_2$ ) difiere significativamente ( $P<0.05$ ) de las concentraciones de tiner, incluido el control negativo (DMSO). Después de 1 hora de tratamiento, las concentraciones media y alta del tiner y el control positivo presentaron un aumento significativo ( $P<0.05$ ) de muerte celular con respecto al control negativo; tras 4 horas de tratamiento el control positivo presentó un aumento significativo de muerte celular con respecto a los demás tratamientos ( $P<0.05$ ); transcurridas 6 horas de tratamiento la concentración alta del tiner y el control positivo mostraron un aumento significativo en el porcentaje de muerte celular con respecto al control negativo ( $P<0.05$ ); y tras 24 horas de tratamiento la concentración alta del tiner fue la única en presentar un aumento significativo de muerte celular ( $P<0.05$ ).

**Cuadro 5.** Muerte celular (%) de linfocitos humanos aislados cultivados *in vitro* y tratados con diferentes concentraciones del tiner, evaluado mediante citometría de flujo por medio de características morfológicas. Se reporta el resultado obtenido en 7 repeticiones, con su respectiva media ( $\bar{X}$ ) y error estándar (EE).

		Muerte celular (%)					$\bar{X} \pm EE^*$ <b>P&lt;0.0001<sup>a</sup></b>
Tratamientos	Concentración ( $\mu\text{L/mL}$ )	Tiempo de tratamiento (horas)					
		0,5	1	4	6	24	
DMSO	1%	11,406 $\pm$ 0,778	9,629 $\pm$ 0,778	10,809 $\pm$ 0,778	11,142 $\pm$ 0,778	16,199 $\pm$ 0,778	11,837 $\pm$ 0,401
BAJA	0,10	11,521 $\pm$ 0,778	10,234 $\pm$ 0,778	11,436 $\pm$ 0,778	13,576 $\pm$ 0,778	19,325 $\pm$ 0,778	13,218 $\pm$ 0,539 <sup>e</sup>
MEDIA	0,20	11,570 $\pm$ 0,778	12,740 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	10,949 $\pm$ 0,778	15,139 $\pm$ 0,778	19,670 $\pm$ 0,778	14,013 $\pm$ 0,492 <sup>e</sup>
ALTA	0,40	14,968 $\pm$ 0,778	15,180 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	13,104 $\pm$ 0,778	17,465 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	24,177 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	16,978 $\pm$ 0,565 <sup>e</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 $\mu\text{M}$	17,034 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	16,844 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	16,614 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	18,999 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	21,761 $\pm$ 0,778 <sup>f</sup>	18,250 $\pm$ 0,444 <sup>e</sup>
$\bar{X} \pm EE^{**}$		13,299 $\pm$ 0,390	12,925 $\pm$ 0,435	12,582 $\pm$ 0,404	15,264 $\pm$ 0,470 <sup>d</sup>	20,226 $\pm$ 0,560 <sup>d</sup>	<b>P&lt;0.0001<sup>c</sup></b>

\*Los datos corresponden al promedio de muerte celular  $\pm$  error estándar para los tratamientos

\*\*Los datos corresponden al promedio de muerte celular  $\pm$  error estándar para el tiempo de tratamiento

<sup>a</sup> Significancia estadística entre los tratamientos. Prueba de Kruskal-Wallis

<sup>b</sup> Significancia estadística entre los tiempos de tratamiento. Prueba de Kruskal-Wallis

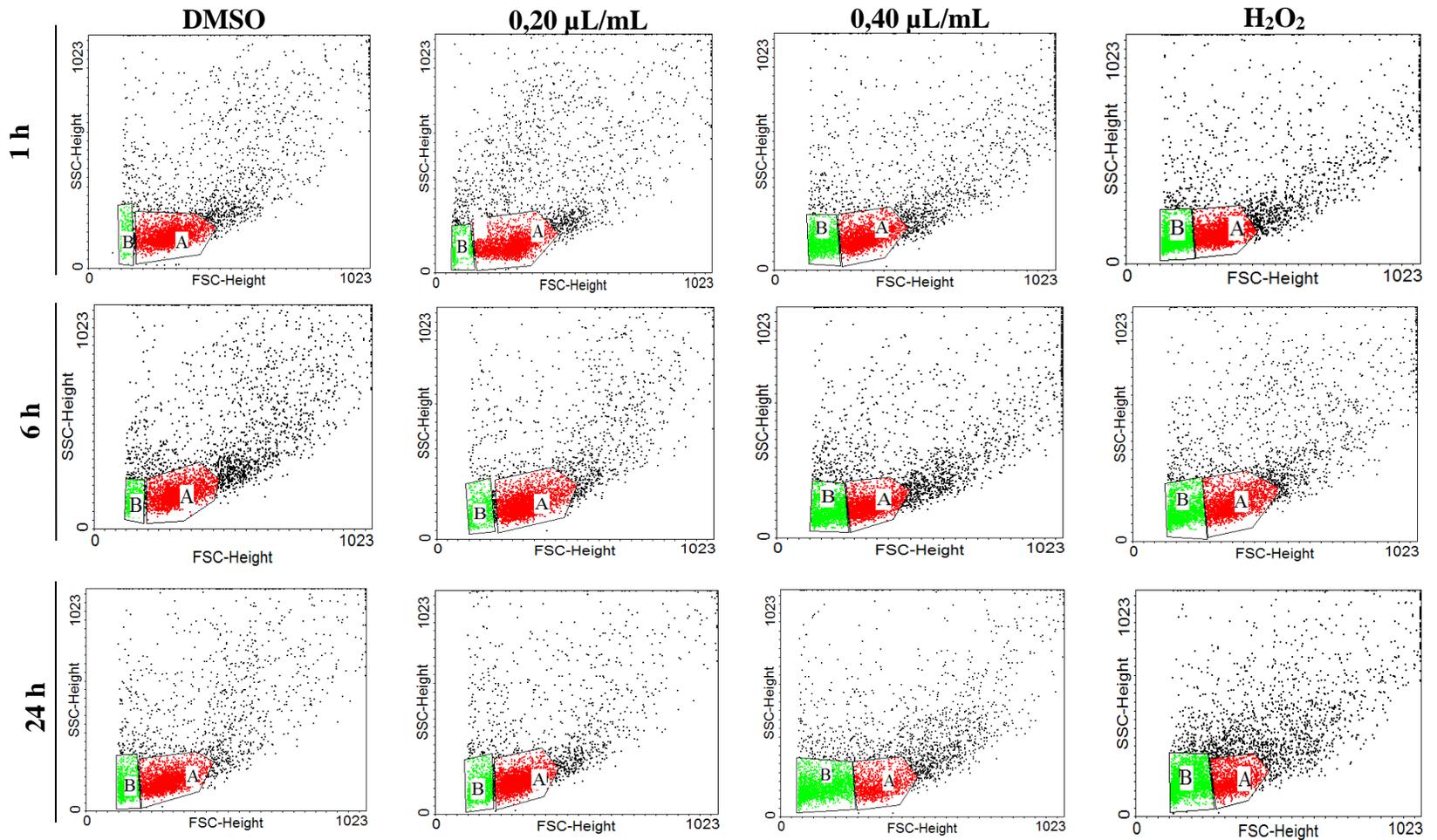
<sup>c</sup> Significancia estadística de la interacción entre los tratamientos y el tiempo. Prueba de Kruskal-Wallis

<sup>d</sup> Tiempos de tratamiento con los valores más altos de muerte celular, que difieren del resto, según prueba T3 de Dunnet (P<0.05)

<sup>e</sup> Tratamientos que difieren significativamente del control negativo (DMSO), según prueba T3 de Dunnet (P<0.05)

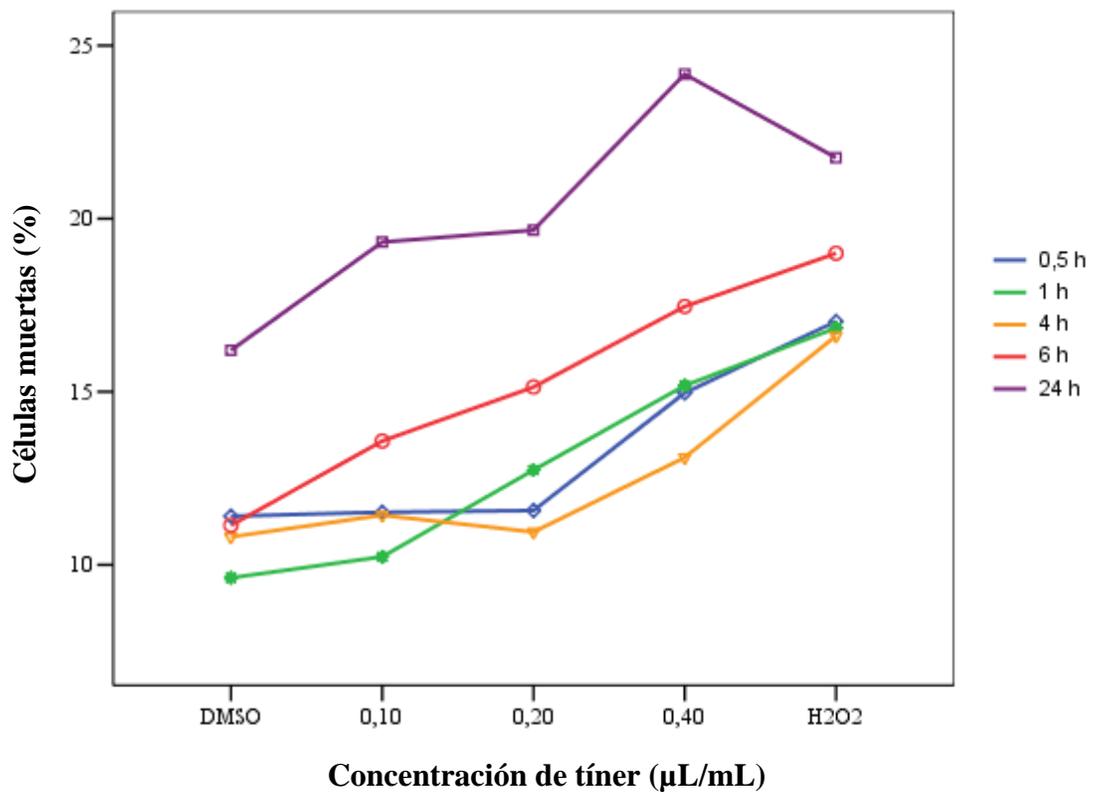
<sup>f</sup> Valores de muerte celular que difieren significativamente del tratamiento control negativo (DMSO) y los distintos tiempos. según prueba T3 de Dunnet (P<0.05)

**Figura 13.** Análisis de muerte celular de linfocitos humanos aislados cultivados y tratados *in vitro* con el tíner por medio de citometría de flujo. Se presenta el análisis de las características morfológicas de las células a través del FSC y SSC. Las poblaciones celulares son indicadas: A células viables y B células muertas, tras 1, 6 y 24 horas de tratamiento con el control negativo (DMSO), las concentraciones media (0,20  $\mu\text{L/mL}$ ) y alta (0,40  $\mu\text{L/mL}$ ) del tíner y el control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las imágenes son representativas de 7 experimentos.



En la figura 14 se puede apreciar que al tratar los linfocitos humanos durante 24 horas con el t ner, se induce un porcentaje máximo de muerte celular con los diferentes tratamientos; los valores promedio de muerte celular de los linfocitos tratados con las concentraciones baja ( $19,325 \pm 0,778$ ) y media ( $19,670 \pm 0,778$ ) en este periodo de tiempo son muy semejantes, mientras que los tratados con la concentración alta ( $24,177 \pm 0,778$ ) presentan el mayor porcentaje de muerte celular con respecto a las diferentes concentraciones de t ner, aun por encima del porcentaje de muerte celular encontrado para el control positivo ( $21,761 \pm 0,778$ ).

**Figura 14.** Cinética de la muerte celular de linfocitos humanos aislados, tratados *in vitro* con t ner a diferentes tiempos.



#### 8.4 EFECTO APOPTÓTICO MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA V-FITC Y YODURO DE PROPIDIO (IP) EVALUADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Teniendo en cuenta que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento y la concentración del tíner, se presenta un incremento en el porcentaje de muerte celular de los linfocitos humanos aislados, se identificó la naturaleza de la muerte celular (apoptótica o necrótica) inducida por este químico, mediante el marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio evaluado por citometría de flujo. Para este propósito se seleccionó el tiempo de tratamiento en el cual se presentó el mayor porcentaje de muerte celular (24 horas).

El porcentaje de muerte celular apoptótica para las diferentes concentraciones del tíner, se ajusta a la distribución normal (según prueba de normalidad de Shapiro-Wilk,  $P > 0,05$ ), debido a esto se procedió a emplear pruebas de significancia estadística de carácter paramétrico. La tabla 4 resume los valores promedio del efecto apoptótico inducido por el tíner en linfocitos humanos aislados, *in vitro*, después de 24 horas de tratamiento. Se evidenció una diferencia significativa estadísticamente (ANOVA multivariada,  $P < 0,001$ ) en el porcentaje de muerte celular apoptótica temprana y tardía de linfocitos tratados con tíner. Mediante el análisis de comparaciones múltiples de Duncan se establece que las concentraciones de tíner (0,10, 0,20 y 0,40  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y el control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), incrementan la muerte celular apoptótica temprana y apoptótica tardía y/o necrótica de linfocitos humanos aislados.

Se observa que al tratar los linfocitos humanos aislados, con la concentración alta del tíner (0,40  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), el porcentaje de células en apoptosis temprana ( $36,1550 \pm 0,27483\%$ ) aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) con respecto al control negativo (DMSO=  $14,5180 \pm 0,34181$ ); mientras que en la concentración baja (0,10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) que fue de  $26,5370 \pm 0,21723$  y en la concentración media (0,20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) que fue de  $27,0800 \pm 0,30294$  no se presentó diferencia significativa entre ellas, pero si con respecto al control negativo; el control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fue el que presentó el mayor porcentaje de células en apoptosis temprana ( $59,1860 \pm 0,30776$ ) comparado con el resto de los tratamientos. Por otra parte, al analizar el porcentaje de células apoptóticas tardías o necróticas, se observa que todos los tratamientos difieren significativamente del control negativo ( $4,2600 \pm 0,18731$ ) y que el tratamiento con el valor más alto que difiere significativamente del resto, es la concentración de 0,40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $31,4540 \pm 0,36591$ ), aun por encima del control positivo ( $24,9820 \pm 0,18543$ ) (Figura 15).

Mediante el análisis de correlación de Pearson se establece una asociación lineal entre el porcentaje de apoptosis temprana ( $R=0,935$ ), apoptosis tardía ( $R=0,912$ ), y la concentración del tíner. Dicha asociación se caracteriza por una relación concentración-efecto positiva entre la muerte celular apoptótica y las concentraciones del tíner. De igual forma, al evaluar el coeficiente de determinación de apoptosis temprana ( $R^2= 0,875$ ) y apoptosis tardía o necrosis ( $R^2= 0,832$ ), se deduce que la variabilidad observada correspondiente al 87.5% y 83.17% respectivamente, es consecuencia del tratamiento con diferentes concentraciones del tíner (Figura 16).

Las ecuaciones lineales ( $y = a + bx$ ) que describen la relación entre la muerte celular apoptótica y la concentración del tiner son las siguientes:

$$\text{Apoptosis Temprana} = 17,511 + (48,925 * \text{concentración tiner } \mu\text{L/mL})$$

$$\text{Apoptosis Tardía y/o Necrosis} = 9,242 + (61,011 * \text{concentración tiner } \mu\text{L/mL})$$

**Tabla 4.** Apoptosis en linfocitos humanos *in vitro* inducida por el tiner durante 24 horas de tratamiento, evaluada a través de citometría de flujo mediante el marcaje con anexina V y yoduro de propidio.

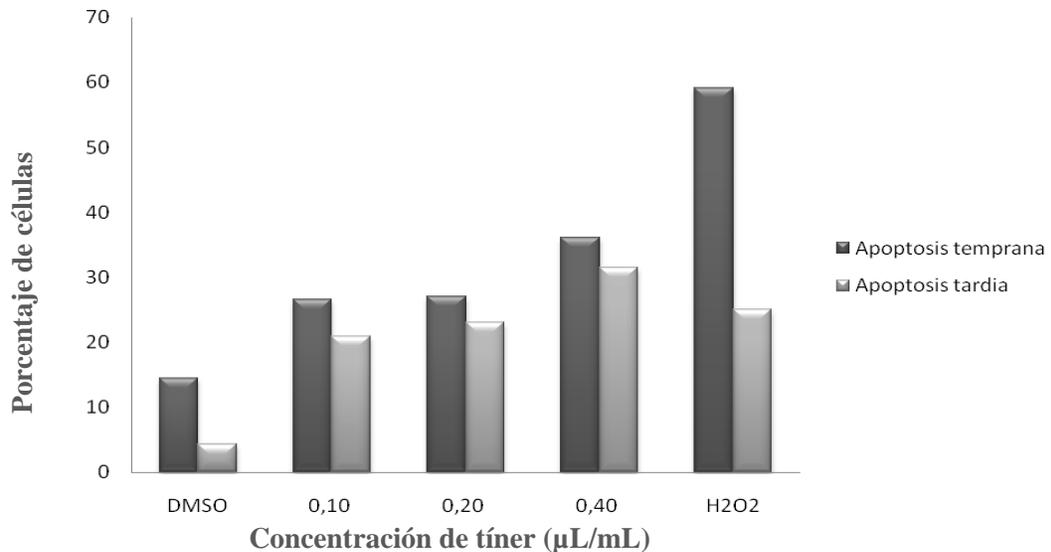
Prueba de apoptosis			
Tratamientos	Concentración ( $\mu\text{L/mL}$ )	Apoptosis temprana (%) $\bar{X} \pm \text{EE}^*$	Apoptosis tardía y/o necrosis (%) $\bar{X} \pm \text{EE}^*$
DMSO	0,00	14,5180 $\pm$ 0,34181	4,2600 $\pm$ 0,18731
Baja	0,10	26,5370 $\pm$ 0,21723 <sup>a</sup>	20,9220 $\pm$ 0,16710 <sup>a</sup>
Media	0,20	27,0800 $\pm$ 0,30294 <sup>a</sup>	23,0380 $\pm$ 0,27507 <sup>a</sup>
Alta	0,40	36,1550 $\pm$ 0,27483 <sup>a</sup>	31,4540 $\pm$ 0,36591 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 $\mu\text{M}$	59,1860 $\pm$ 0,30776 <sup>a</sup>	24,9820 $\pm$ 0,18543 <sup>a</sup>
Análisis Estadístico**		F = 3267,303; P < 0,001	F = 1667,652; P < 0,001

\*Los datos corresponden al promedio de las medias  $\pm$  error estándar (EE) obtenidas del análisis de 10000 células por cultivo (20000 células por tratamiento) y 5 repeticiones del experimento.

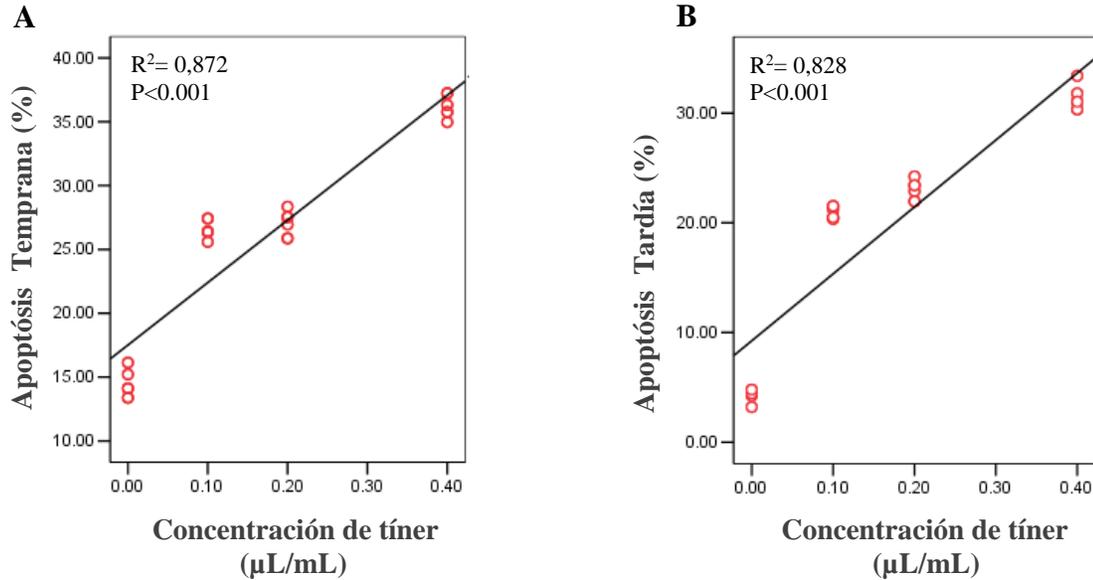
\*\*La comparación de los tratamientos se realizó mediante ANOVA multivariada ( $P < 0,001$ ).

<sup>a</sup> Corresponde a los tratamientos que difieren significativamente del control negativo según la prueba de comparaciones múltiples Duncan ( $P < 0,05$ )

**Figura 15.** Efecto apoptótico en linfocitos humanos aislados de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de tiner durante 24 horas.



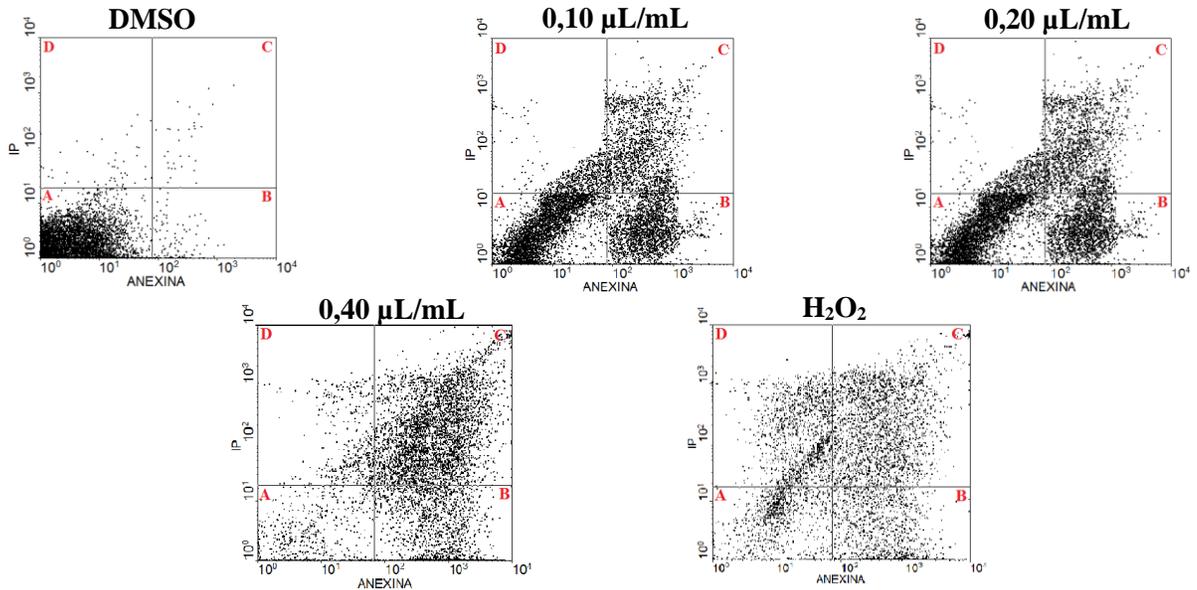
**Figura 16.** Asociación lineal positiva entre la muerte celular apoptótica en linfocitos humanos aislados tratados *in vitro* durante 24 horas y la concentración de tñner. (A) y (B) Se observa que el porcentaje de apoptosis temprana y apoptosis tardía o necrosis aumenta a medida que la concentración es mayor.



En la figura 17 se observan cuatro poblaciones diferentes de linfocitos que fueron detectadas. En la región A se encuentran las células que son negativas para anexina V y yoduro de propidio, consideradas como células viables; en la región B las células en apoptosis temprana, positivas para anexina V pero negativas para IP; la región C con células en apoptosis tardía o necrosis, positivas para anexina V y IP; y en la región D las células con daño en la membrana, negativas para anexina V y positivas para IP. Para el análisis del efecto apoptótico se tuvieron en cuenta las regiones B y C.

Por otra parte, para determinar si la disminución observada en el índice mitótico inducida por el tñner en linfocitos humanos aislados estaba asociada con muerte celular, se estableció la viabilidad celular mediante el marcaje con anexina V y yoduro de propidio evaluado por citometría de flujo, tras 24 horas de tratamiento con las concentraciones baja, media y alta del tñner. Debido a que los datos no cumplen con la asunción de normalidad y homogeneidad de varianza, se analizaron mediante prueba de significancia estadística no paramétrica, con un nivel máximo de significancia de 0,05. En la tabla 4 se muestra el porcentaje de viabilidad celular de linfocitos humanos aislados tratados *in vitro* con el tñner durante 24 horas. Se evidenció una diferencia significativa estadísticamente (Kruskal-Wallis,  $P < 0,0001$ ) en la viabilidad celular de los linfocitos aislados tratados con el tñner.

**Figura 17.** Análisis de apoptosis de linfocitos humanos aislados cultivados y tratados *in vitro* con el tiner por medio de citometría de flujo. Se presenta el análisis de la apoptosis por medio del marcaje de anexina V y IP. Las poblaciones celulares son indicadas: A células viables; B apoptosis temprana, C apoptosis tardía o necrosis y D daño en la membrana celular, después de 24 horas de tratamiento con el control negativo (DMSO), las concentraciones baja (0,10  $\mu\text{L/mL}$ ), media (0,20  $\mu\text{L/mL}$ ) y alta (0,40  $\mu\text{L/mL}$ ) del tiner y al control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las imágenes son representativas de 5 experimentos.



Mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan se establece que las concentraciones de tiner (0,10, 0,20 y 0,40  $\mu\text{L/mL}$ ) y el control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), disminuyen significativamente ( $P < 0.05$ ) la viabilidad celular de linfocitos humanos aislados, con respecto al control negativo (DMSO). Se observa que al tratar los linfocitos humanos aislados con la concentración alta del tiner (0,40  $\mu\text{L/mL}$ ) la viabilidad celular disminuyó significativamente ( $26,460 \pm 0,194$ ) respecto del porcentaje de viabilidad celular del resto de concentraciones (control negativo =  $78,504 \pm 0,140\%$ , baja =  $35,618 \pm 0,194\%$  y media =  $32,052 \pm 0,428\%$ ;  $P < 0,0001$ ). El control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fue el que presentó la mayor disminución en el porcentaje de viabilidad celular ( $11,156 \pm 0,341\%$ ;  $P < 0,0001$ ) comparado con el resto de los tratamientos (Tabla 4).

En la figura 18 se puede apreciar que al tratar los linfocitos con la concentración alta del tiner (0,40  $\mu\text{L/mL}$ ), la viabilidad celular disminuyó a un 33% respecto del control negativo, mientras que con las concentraciones baja (0,10  $\mu\text{L/mL}$ ) y media (0,20  $\mu\text{L/mL}$ ) la viabilidad disminuyó a un 45 y 44% respectivamente con respecto al control negativo (DMSO), por lo que se infiere que la disminución de la viabilidad celular es dependiente de la concentración del tiner, tras 24 horas de tratamiento.

**Tabla 5.** Viabilidad celular (%) de linfocitos humanos (aislados) después de 24 horas de tratamiento *in vitro* con tiner. Se reporta el resultado obtenido en 5 repeticiones, con su respectiva media ( $\bar{X}$ ) y error estándar (EE).

Prueba de viabilidad celular		
Tratamientos	Concentración ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Viables (%) $\bar{X} \pm \text{EE}^*$
Control negativo (DMSO)	1%	78,5040 $\pm$ 0,14034
Baja	0,10	35,6180 $\pm$ 0,19491 <sup>a</sup>
Media	0,20	32,0520 $\pm$ 0,42885 <sup>a</sup>
Alta	0,40	26,4600 $\pm$ 0,19439 <sup>a</sup>
Control positivo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	40 $\mu\text{M}$	11,1560 $\pm$ 0,34105 <sup>a,b</sup>
Total		43,1585 $\pm$ 3,31167
Análisis Estadístico**		$X^2 = 47,183$ ; $P < 0,0001$

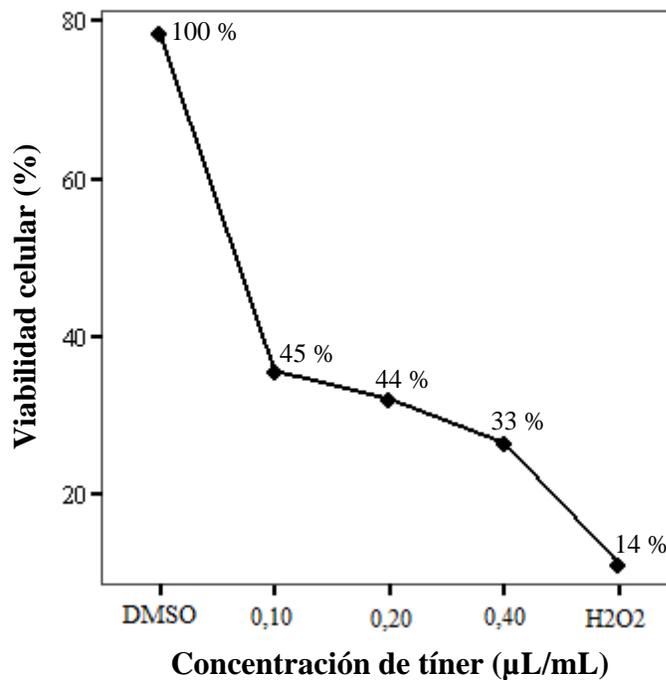
\*Los datos corresponden al promedio del porcentaje de viabilidad celular  $\pm$  error estándar (EE) obtenidas del análisis de 100000 células por tratamiento.

\*\*La comparación de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $P < 0,0001$ ).

<sup>a</sup> Tratamientos que difieren significativamente del control negativo, según prueba de Duncan ( $P < 0,05$ )

<sup>b</sup> Tratamiento con el valor más bajo de viabilidad celular, que difiere significativamente del control negativo según prueba de Duncan ( $P < 0,05$ ).

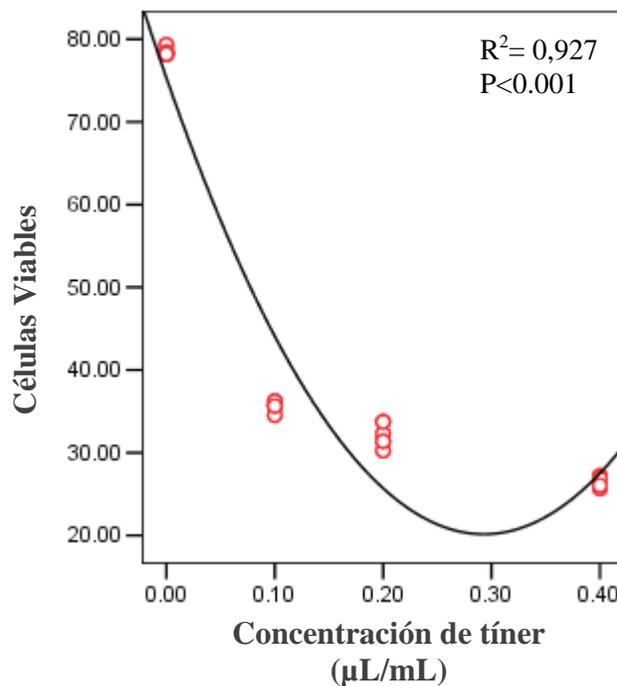
**Figura 18.** Viabilidad celular (%) de linfocitos humanos (aislados) después de 24 horas de tratamiento *in vitro* al tiner. El porcentaje de células viables en los cultivos disminuye a medida que la concentración aumenta.



Mediante el análisis de correlación se puede observar una aproximación curvilínea cuadrática ( $R^2= 0,927$ ) y una asociación negativa al relacionar las células viables y las concentraciones del tiner ( $R= -0.789$ ) (Figura 19). Por lo anterior se infiere que la disminución de la viabilidad celular en los linfocitos humanos aislados, depende en un 92,7 % de la concentración del tiner. La ecuación cuadrática [ $y = b_0 + (b_1 * x) + (b_2 * x^2)$ ] que describe la relación entre la viabilidad celular y la concentración del tiner es la siguiente:

$$\text{Células Viables (\%)} = 75,329 - (376,745 * \text{concentración tiner } \mu\text{L/mL}) + (643,045 * (\text{concentración tiner } \mu\text{L/mL})^2).$$

**Figura 19.** Asociación cuadrática entre las concentraciones del tiner y la viabilidad celular (%) de linfocitos humanos (aislados) después de 24 horas de tratamiento *in vitro*.



## 9. DISCUSIÓN

En Colombia muchas personas están en continua exposición a los solventes orgánicos sin tener en cuenta las normas de bioseguridad adecuadas para su manipulación y los efectos que a largo plazo puedan provocar en la salud, debido a que los vapores de estos productos pasan al ambiente y llegan a las personas por las distintas vías de absorción, ocasionando irritación de las vías respiratorias superiores y afectando la nariz, la garganta y los pulmones. Varios estudios han señalado que la exposición crónica a solventes orgánicos puede provocar disfunción en el sistema nervioso central (SNC) [10, 31, 82], sin embargo, no se conocen los mecanismos que provocan esta disfunción. De igual forma, se ha demostrado que personas expuestas ocupacionalmente a tolueno y a mezclas de solventes orgánicos presentan pérdidas en las funciones auditivas [107, 118] y visuales [142, 167]. Además, se ha reportado una asociación entre la exposición a solventes orgánicos y el desarrollo de diversas enfermedades como Alzheimer's [86], esclerosis múltiple [88] y Parkinson [57, 147, 158].

La citotoxicidad es considerada como un componente principal para la inducción de muerte celular. Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* son útiles y necesarias para identificar la habilidad y el rango de concentración de un compuesto en el cual induce muerte celular como consecuencia de daños en las funciones celulares básicas [44]. La mayoría de pruebas citotóxicas *in vitro* para la determinación de muerte celular, miden la necrosis, sin embargo, en la actualidad la apoptosis es ampliamente evaluada por diversos métodos. No se conocen los efectos del tóxico en el proceso apoptótico o la concentración en la que induce este proceso; por lo que fue importante, evaluar a nivel celular los efectos del tóxico por medio de un biomarcador de respuesta como la apoptosis que monitorea de forma ideal la secuencia de cambios asociados con el stress celular inducido por xenobióticos.

Estudios han demostrado que el uso de diversos métodos *in vitro* pueden predecir bien los efectos tóxicos de diferentes sustancias en humanos [27, 45], para lo cual es importante que el método presente un fácil funcionamiento y un alto rendimiento. Estas ventajas las presenta la citometría de flujo ya que ofrece la posibilidad de ensayos multiparamétricos de una gran cantidad de células en un periodo de tiempo corto, convirtiéndose en una herramienta valiosa para la investigación de la citotoxicidad *in vitro*, con énfasis especial en los mecanismos de toxicidad química, tanto en células adherentes como en células en suspensión [59, 155].

Los linfocitos humanos de sangre periférica (LSP) han sido utilizados para el monitoreo de daño genético inducido ambientalmente a través de una variedad de métodos, incluyendo alteraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos [127] y mutaciones somáticas [28], por lo que en este estudio se decidió trabajar con los LSP. Sin embargo, se ha demostrado en estudios *in vitro* que las diferentes células presentes en la sangre total causan daño oxidativo en el DNA de los linfocitos, debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) por los neutrófilos, y la

liberación de hemoglobina y  $H_2O_2$  por los eritrocitos [113]. Por lo que se determino el uso de linfocitos humanos aislados, para evitar el sesgo de los datos por la presencia de variables diferentes a los tratamientos de tiner.

## **9.1 CITOTOXICIDAD EN LINFOCITOS HUMANOS AISLADOS TRATADOS CON TÍNER**

El índice mitótico como biomarcador de proliferación celular, ha sido ampliamente utilizado para evaluar citotoxicidad midiendo la proporción de células en la fase M del ciclo celular. En este estudio, el análisis de la citotoxicidad del tiner realizado mediante la prueba de índice mitótico, mostró un efecto significativo concentración – respuesta negativo ( $R = -0,986$ ,  $P < 0,001$ ), presentando una disminución significativa del índice mitótico a medida que los linfocitos eran tratados con concentraciones mayores de tiner; el IM fue reducido en un 50% a una concentración de  $0,20 \mu\text{L/mL}$ , en un 30% a una concentración de  $0,40 \mu\text{L/mL}$  con respecto al control negativo y no presento disminución significativa a las concentraciones de  $0,05$  y  $0,10 \mu\text{L/mL}$ .

El efecto depresor del número de metafases inducido por el aumento en la concentración del tiner, indica un efecto citotóxico premitótico, presumiblemente en etapas de la interfase (G1, S, G2), ya que se ha restringido la cantidad de células que pasan a la fase M; es decir, la disminución del IM refleja una inhibición del proceso del ciclo celular y/o pérdida de la capacidad proliferativa, fenómeno posiblemente causado por muerte celular necrótica y/o apoptótica [136]. Estos resultados sugieren que la reducción del índice mitótico puede ser consecuencia del efecto de este solvente sobre la fase S del ciclo celular, ya que se conoce que en dicha fase actúan la gran mayoría de agentes clastogénicos, catalogados como S – dependientes [16].

De igual forma se investigó la viabilidad de los LSP tratados durante 24 horas con las concentraciones alta ( $0,40 \mu\text{L/mL}$ ), media ( $0,20 \mu\text{L/mL}$ ) y baja ( $0,10 \mu\text{L/mL}$ ) del tiner, determinadas mediante la prueba de índice mitótico. Este análisis se realizó mediante el uso de citometría de flujo y el kit de anexina V (Células negativas para yoduro de propidio y anexina V). Observándose una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a medida que la concentración del tiner aumentaba ( $R = -0,789$ ,  $P < 0,001$ ). La reducción en la viabilidad celular, puede ser causada por una interacción directa de este químico con estructuras celulares principales como la membrana celular o por la inducción de daños estructurales y alteraciones en las funciones básicas celulares, que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis, posiblemente por el tratamiento con tiner en las condiciones evaluadas. Se conoce que mantener la integridad de la membrana es esencial para la homeostasis celular y diversos estudios han indicado que los solventes orgánicos dañan la membrana y alteran la función de proteínas membranales [43, 145, 156], con una correlación entre la toxicidad de los diferentes compuestos, su concentración e hidrofobicidad [42]. La funcionalidad de la membrana como barrera selectiva de iones y moléculas hidrofílicas, es fuertemente afectada por la acumulación de hidrocarburos, como los solventes orgánicos, en la bicapa lipídica y los cambios consecuentes en la estructura membranal debido a la disrupción de las interacciones lípido – proteínas y/o cambios en la

fluidez y aumento evidente en el área superficial de la membrana, debido a la hinchazón por la acumulación de compuestos lipofílicos [145].

Los resultados de viabilidad celular obtenidos en este estudio se relacionan con los encontrados por Hidalgo y Londoño en el 2007 [65], utilizando la prueba de exclusión celular con azul de tripano, donde se evidenció una disminución dosis-dependiente de la viabilidad celular de los linfocitos humanos de sangre periférica al ser expuestos *in vitro* durante 4 horas a concentraciones de tñer incrementadas. Además, de revelar que la membrana celular es el blanco primario de los solventes orgánicos contenidos en el tñer.

Mc Dermott, *et al*, 2007 [99], mediante pruebas de integridad membranal, demostraron que los daños en la membrana de líneas celulares Jurkat T y SH-SY5Y (línea celular de neuroblastoma) expuestas durante 5 días a tolueno, n-hexano y metil-etil-cetona (MEK) se presentan de forma dependiente de la concentración y además se observa un incremento potenciado por la hidrofobicidad del solvente (hexano>tolueno>MEK). Los efectos de los solventes orgánicos en las membranas han sido investigados en líneas celulares LLC-PK1 [5] y en células granulares del cerebelo de ratas [42], después de una exposición aguda a tolueno y p-xileno, mediante la cuantificación de Lactato deshidrogenasa (LDH), mostrando una inducción de pérdida de la integridad de la membrana. Además de otros estudios que han identificado una disminución de la viabilidad de líneas celulares derivadas de humanos [13, 30, 32], lo que muestra que la membrana celular es uno de los blancos principales de estos compuestos.

El resultado del efecto citotóxico del tñer al parecer esta mediado por un efecto sinérgico de los componentes activos del tñer, que incluyen tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, hexano, 2,3-dimetilhexano, nonano, isobutano, octano y etilbenceno entre otros [68]. Lo anterior, es soportado por estudios realizados por McDermott y colaboradores, quienes evaluaron la exposición al tolueno y n-hexano de manera individual y como mezcla binaria, en líneas celulares Jurkat T y concluyeron que la mezcla de solventes orgánicos es más tóxica aun a bajas concentraciones por su efecto sinérgico [100]. En otro estudio realizado en líneas celulares humanas normales expuestas a benceno, tolueno, etilbenceno y xileno se encontró un efecto sinérgico al evaluar los solventes orgánicos de manera individual y como mezcla compleja [32], debido a que se presentó una alta citotoxicidad celular.

Los resultados de este estudio muestran que el tñer, bajo las condiciones experimentales, presentó efecto citotóxico en linfocitos humanos aislados de sangre periférica *in vitro*. Al parecer, la mezcla compleja de solventes orgánicos, a las concentraciones valoradas, interactúa con estructuras celulares de los linfocitos de importancia biológica para la homeostasis celular, siendo el blanco principal la membrana celular, la cual puede ser alterada en su funcionalidad, estructura y permeabilidad. Con el fin de determinar si la inhibición del progreso del ciclo celular y/o pérdida de la capacidad proliferativa, es causado por muerte celular apoptótica o por necrosis se llevó a cabo la prueba de cuantificación de apoptósisis mediante marcaje de las células con el kit de anexina V – FITC y se analizó mediante citometría de flujo.

## 9.2 CINÉTICA DE MUERTE CELULAR EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO CON TÍNER

Se estudió la cinética de la muerte celular (apoptótica y necrótica) de los linfocitos humanos aislados, tratados *in vitro*, con las concentraciones baja, media y alta del tiner mediante citometría de flujo, con el fin de determinar la influencia de este químico en el porcentaje de células muertas tras diferentes tiempos de tratamiento. El análisis se realizó partiendo de la habilidad que presentan las células para dispersar la luz, que es alterada durante el proceso de muerte celular, reflejando cambios morfológicos como hinchamiento y disrupción de la membrana celular, y en el caso de la apoptosis, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

El análisis de la cinética de muerte celular de los linfocitos humanos aislados de sangre periférica se realizó por medio de citometría de flujo de acuerdo a las características morfológicas que presentan las células y de sus propiedades de dispersión de la luz: Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC). Se observó un incremento significativo ( $P < 0.001$ ) de muerte celular de linfocitos humanos aislados tratados con tres concentraciones del tiner (alta, media y baja), con respecto al control negativo (DMSO). Lo que indica que el tiner presenta efecto directo sobre estructuras básicas de la célula.

La citometría de flujo es una técnica ampliamente usada para la investigación de muerte celular de linfocitos humanos, uno de los métodos más sencillos es analizar los cambios morfológicos que acompañan este proceso (el tamaño celular y la granularidad o complejidad celular), los cuales pueden ser detectados por las propiedades de dispersión de la luz [25]. Los cambios de la dispersión de la luz pueden ser considerados información importante para determinar la muerte celular, y esto va a variar para cada tipo de célula dependiendo de su organización nucleoplasmática y otras características. El forward scatter (FSC) describe el diámetro de la célula y el side scatter (SSC) describe la conformación de estructuras intracelulares. Durante estados iniciales de la apoptosis la célula se encoge, pero la membrana permanece intacta. Durante la necrosis ocurre un hinchamiento de la célula que resulta, en etapas tempranas, en el rompimiento de la integridad de la membrana. Una consecuencia de estos cambios celulares es la disminución del FSC y de SSC durante etapas iniciales de la apoptosis [35, 151], durante la necrosis ocurre un aumento inmediato del FSC y disminución del SSC [39].

En los datos obtenidos en esta investigación se observó una disminución significativa en el tamaño y complejidad celular al someter los linfocitos humanos *in vitro* a las concentraciones del tiner (0.10, 0.20 y 0.40  $\mu\text{L/mL}$ ) durante 0.5, 1, 4, 6 y 24 horas; la concentración alta indujo un mayor porcentaje de muerte celular a las 24 horas de tratamiento, aun por encima del control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). De igual forma, permiten inferir que el porcentaje de muerte celular está influenciado principalmente por la concentración del tiner la cual es dependiente del tiempo de tratamiento debido a que se obtuvo a las 24 horas los porcentajes más significativos en las diferentes concentraciones de compuesto.

Una investigación realizada para determinar el daño genético y citotóxico en linfocitos humanos después de una hora de exposición con tres concentraciones de tiner (0.05, 0.1 y 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) sugirió que los componentes de esta mezcla de solventes, alteran la estructura de la membrana celular y del ADN generando lesiones primarias (rupturas de cadena y sitios lábiles al álcali) de una forma dosis-dependiente, lo cual posiblemente puede estar asociado con procesos de estrés oxidativo o alquilación del ADN [65]. De esta forma se establece que el incremento en el porcentaje de células muertas a medida que aumenta el tiempo de tratamiento y la concentración del tiner puede estar relacionado con un aumento de daños en el ADN, producidos posiblemente por procesos de estrés oxidativo o alquilación del ADN.

El incremento de la muerte celular dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento de los linfocitos al tiner puede explicarse por un aumento de las especies reactivas de oxígeno formadas por los diferentes químicos presentes en esta mezcla compleja. Un estudio realizado por Dreiem y colaboradores en el 2002 [41], utilizando líneas celulares de cerebelo de ratas, demostró que existe una relación directamente proporcional entre la producción de especies reactivas de oxígeno y el tiempo de exposición a diversos solventes orgánicos presentes en el tiner, encontrando que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento también hay un incremento de especies reactivas de oxígeno en el medio de cultivo.

### **9.3 EFECTO APOPTÓTICO EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON TÍNER**

Es de gran interés conocer la relación existente entre el daño en el DNA, la apoptosis y la carcinogénesis. Los daños en el DNA inducen la activación de la proteína p53, activación de endonucleasas, fragmentación del DNA y otros cambios morfológicos y bioquímicos que conducen a la apoptosis. La célula tiene dos caminos que puede tomar cuando ha sufrido daño en su DNA, el primero es la apoptosis y el segundo la reparación del daño en el DNA, que si no se realiza correctamente produce mutaciones que conducen a la carcinogénesis. Las células que presentan un gran daño en el DNA y siguen el proceso apoptótico, no son capaces de iniciar un proceso carcinogénico pero si de causar disfunción en los diferentes tejidos que presenten un exceso de muerte celular por este mecanismo. En cambio cuando el daño inducido en el DNA es débil, la respuesta celular permite la reparación del mismo. Sin embargo, si el daño no es eficientemente reparado, las lesiones mutagénicas podrían propagarse y consecuentemente llevar a un proceso de carcinogénesis. Teniendo en cuenta lo anterior, la respuesta celular dependerá de la intensidad del daño en el DNA y de la habilidad de repararlo.

La apoptosis contribuye en la patogénesis de un gran número de enfermedades, incluyendo el cáncer. La muerte celular se da como respuesta a daños en el DNA y se ha demostrado que el tipo de muerte que prevalece es la apoptosis [150]. La apoptosis es inducida por muchos tóxicos y se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos como la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

Las pruebas para la determinación de muerte celular apoptótica son ampliamente utilizadas para evaluar los efectos citotóxicos causados por químicos como los solventes orgánicos. En el presente estudio se empleó el marcaje con anexina V y yoduro de propidio evaluado a través de citometría de flujo para determinar el efecto apoptótico inducido por el tiner en linfocitos humanos aislados de sangre periférica. El método usado es basado en la unión de la anexina V-FITC a la fosfatidilserina, la cual se encuentra en la superficie externa de la membrana en células apoptóticas pero no en células viables. Esta metodología ha sido empleada extensamente debido a la fácil discriminación entre las células en apoptosis temprana (anexina V+; IP-) y células en apoptosis tardía (anexina V+; PI+). El marcaje con anexina V puede ser usado tanto en citometría de flujo como en microscopia de fluorescencia, y con algunas precauciones, tanto en células fijadas como vivas [85, 140, 157].

El tiner, compuesto por una mezcla compleja de diversos hidrocarburos alifáticos (hexano, 2,3-dimetilhexano, nonano, isobutano y octano) y aromáticos (tolueno, xilenos y etilbenceno), indujo muerte celular apoptótica en linfocitos humanos de sangre periférica tratados durante 24 horas. Se pudo establecer en este estudio una diferencia significativa estadísticamente de muerte celular apoptótica entre las concentraciones del tiner evaluadas y el control negativo (DMSO). Esto puede ser debido a la interacción de los diferentes compuestos del tiner con distintas estructuras celulares como el DNA o la alteración de funciones básicas. Al exponer los linfocitos a las concentraciones media (0.2 /mL) y baja (0.1 /mL) del tiner, se observó un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de apoptosis con respecto al control negativo. Este aumento puede presentarse como respuesta de las células a cambios en las concentraciones internas de calcio si el estímulo es suficientemente fuerte [117] o a un daño oxidativo producido por un incremento en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) [94].

Los compuestos químicos ampliamente utilizados en las industrias y hogares producen especies reactivas de oxígeno (ROS), que debido a su gran reactividad química son capaces de interactuar de una forma negativa con el DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos. Se ha establecido que la generación o adición de ROS puede causar muerte celular necrótica o apoptótica, dependiendo de la concentración de estos en el ambiente celular [33]. El stress oxidativo, resultado de la alteración de la homeostasis y saturación de los sistemas de defensa de la célula por la producción excesiva de ROS, está directamente implicado en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades incluyendo el SIDA, Parkinson, Alzheimer y desordenes degenerativos en distintos órganos [33]; de igual forma hay una clara relación entre el desarrollo de diversas enfermedades como las mencionadas anteriormente y desórdenes en los procesos de muerte celular [83], lo que permite establecer un vínculo entre la producción de ROS, stress oxidativo y la apoptosis [7, 34, 38, 153].

Estudios recientes han sugerido que la formación de ROS puede ser una parte importante del mecanismo de toxicidad inducido por solventes orgánicos; encontrando que algunos compuestos alifáticos y aromáticos presentes en el tiner inducen individualmente la formación de ROS *in vitro* en células del cerebelo de ratas y que el incremento de la

formación de ROS depende de la concentración e hidrofobicidad de los solventes [41]. También se concluye que los solventes alifáticos presentan una mayor formación de ROS en comparación con los aromáticos, sugiriendo que la toxicidad de los hidrocarburos aromáticos no reside principalmente en su habilidad para inducir ROS. Además se ha reportado la formación de ROS y radicales libres en neutrofilos granulocitos humanos después de exposición *in vitro* a algunos solventes orgánicos [110, 111].

Algunos estudios han demostrado ampliamente la relación existente entre la generación de ROS producidas por los metabolitos del benceno, uno de los componentes principales del tñner, con su citotoxicidad y genotóxicidad. Se ha encontrado que estos metabolitos generan peróxidos intracelulares, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causando rupturas en la cadena de DNA, fragmentación del DNA internucleosomal por endonucleasas y finalmente muerte celular apoptótica [66]. También se ha reportado la producción de radicales hidroxilo en medula ósea de ratones [83] por parte del benceno, y que altas concentraciones de tolueno incrementan la formación de ROS en hígado, pulmón, riñón y cerebro en ratas [95, 96, 97], además de los efectos *in vitro* del tolueno y sus derivados metilados m-, o-, y p-xileno en la generación de ROS, peroxidación lipídica [24, 29, 97, 112] y defectos en la estructura de la mitocondria [87].

Las ROS y los radicales libres son potencialmente dañinos para las células, ya que son altamente reactivos y pueden oxidar macromoléculas celulares. Estudios recientes sugieren que la formación de ROS y el estrés oxidativo están involucrados en la muerte celular inducida por solventes [5, 42], pero diferencias en los efectos de los tres tipos de hidrocarburos (alifáticos, alicíclicos y aromáticos) demuestran que los niveles generales de producción de ROS no predicen completamente su toxicidad. Los tres tipos de solventes inducen ROS en el mismo rango de concentración [41]; sin embargo, los hidrocarburos alifáticos no inducen muerte celular. Si los efectos de ROS fueran causados solamente por reacciones con proteínas, lípidos y DNA entonces los compuestos alifáticos deberían ser igualmente tóxicos que los alicíclicos y aromáticos. Es posible que las diferencias en la localización subcelular de ROS, cinética o diferencias en el tipo de especies reactivas formadas puedan ser críticas para determinar la toxicidad de los solventes orgánicos [42]. De esta forma la respuesta celular dependerá de diferencias en la intensidad y duración del estrés oxidativo.

Un estudio realizado por Al-Ghamdi y colaboradores en el 2003 [5] en líneas celulares LLC-PK1 asume que la exposición *in vitro* a tolueno y p-xileno induce muerte celular apoptótica mediante la expresión de las proteínas pro-apoptóticas caspasa 9 y Bax (vía mitocondrial). Además de sugerir en otro estudio que la exposición *in vitro* a niveles elevados de estrés oxidativo, producidos por el metabolismo del tolueno y p-xileno, induce muerte celular necrótica en líneas celulares LLC-PK1, involucrando la activación del CYP2E1, que participa en el estrés oxidativo como mediador de este proceso, además de evidenciar que estos compuestos inhiben la activación del CYP2E1 [5]; lo que puede explicar los datos obtenidos en este estudio, ya que la concentración alta del tñner (0.40 /mL) presentó un incremento marcado en el porcentaje de células apoptóticas tardías y/o

necróticas, con respecto a las demás concentraciones del compuesto, aun por encima del control positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

El incremento en el porcentaje de muerte celular apoptótica, encontrado en este estudio puede estar también relacionado con un aumento en las lesiones del DNA ocasionadas por el tñer, ya que se conoce que el DNA es el blanco principal de los genotóxicos ambientales (compuestos alquilantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenoles y aminas heterocíclicas). Después de un daño inducido en el DNA, la principal ruta de inactivación celular es la apoptosis. Durante los últimos años, se han identificado lesiones específicas del DNA que son capaces de inducir muerte celular apoptótica. Estas lesiones incluyen O<sub>6</sub>-metilguanina, N-alquilaciones de bases, aductos del DNA, entrecruzamientos de DNA y rupturas de cadena doble (DSBs) [137]. La reparación de estas lesiones son importantes para prevenir el proceso apoptótico. La apoptosis inducida por muchos químicos genotóxicos es la consecuencia del bloqueo de la replicación del DNA, lo cual conlleva a un colapso en la horquilla de replicación y formación de DSBs. Se cree que estos DSBs son cruciales en el desencadenamiento del proceso apoptótico. Por lo argumentado anteriormente, se puede establecer una relación entre el daño genético inducido por el tratamiento con el tñer [65], y el desencadenamiento del proceso de muerte celular apoptótica como mecanismo de respuesta celular ante estos daños.

Por otra parte, algunos estudios han evidenciado que la desregulación en la homeostasis de las concentraciones del calcio intracelular (Ca<sup>+2</sup>), está fuertemente relacionada con el daño en las células y posiblemente muerte celular [117]. La elevación en los niveles intracelulares de calcio acompañado con la generación de estrés oxidativo puede inducir la activación de procesos de muerte celular en linfocitos humanos [91]. De esta forma la muerte celular inducida por solventes orgánicos puede estar relacionada con la capacidad que tienen estos compuestos de incrementar la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular y de producir ROS como se ha observado en líneas celulares Jurkat T y SH-SY5Y [99].

Es importante tener en cuenta las características genóticas de los linfocitos del donante, ya que se conoce que la influencia de los polimorfismos genéticos de enzimas involucradas en la biotransformación de xenobióticos y reparación del DNA, pueden ayudar a determinar la susceptibilidad individual asociada con la exposición a xenobióticos, en este caso el tñer. Mediante un estudio previo de variabilidad individual determinada por los polimorfismos, utilizando técnicas de PCR multiplex y PCR/RFLPs, el donante de los linfocitos aislados evaluado en este estudio, resulto ser positivo para GSTT1 y GSTM1; silvestre (codones 194 y 280) y heterocigoto (codón 399) para XRCC1; silvestre (codón 241) para XRCC3 y silvestre para CYP2E1.

Teniendo en cuenta que en este estudio se controló la influencia de diversos factores externos en la respuesta de los linfocitos al tratamiento con tñer, tales como: estilo de vida (consumo de cigarrillo, drogas psicoactivas, alcohol, etc.), antecedentes familiares de cáncer y enfermedades hereditarias, exposición a radiaciones ionizantes y otros agentes ambientales nocivos que son capaces de inducir daños a nivel celular, se puede concluir, que el tñer tiene un impacto directo sobre la homeostasis celular e independiente de los

factores mencionados. De esta forma se concluye que existe un riesgo incrementado de daño genético y alteración homeostática al presentarse la combinación de factores como el estilo de vida y la exposición ocupacional de manera continua y constante a este tipo de mezcla de solventes orgánicos.

Los resultados de este estudio muestran que el tiner induce efecto apoptótico en forma concentración – dependiente en linfocitos humanos aislados de sangre periférica tratados *in vitro* a las concentraciones evaluadas. Por lo que se sugiere que los componentes del tiner alteran estructuras y funciones básicas de los linfocitos humanos aislados, principalmente por las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo el papel del estrés oxidativo necesita ser aclarado, con la aplicación de pruebas más específicas que permitan evaluar específicamente el daño oxidativo en los efectos tóxicos del tiner. El incremento de la muerte celular apoptótica en los linfocitos humanos aislados de sangre periférica encontrado en este estudio, se relaciona con una disminución de la viabilidad de estas células de gran importancia para la respuesta inmune, lo que permite alertar a las personas que se encuentran constantemente expuestas a este tipo de mezclas complejas de solventes, debido a que se conoce que un incremento de muerte celular apoptótica puede llevar al desarrollo de diversas enfermedades.

## 10. CONCLUSIONES

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada hasta el momento, se puede asegurar que este estudio es el único que evalúa el efecto apoptótico del tiner en linfocitos humanos aislados *in vitro* mediante el marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) por citometría de flujo, que se caracteriza por ser una metodología rápida, muy sensible y de bajo costo.

Los resultados de este estudio relacionan al tiner como una mezcla de agentes inductores de daño citotóxico (reducción del índice mitótico y de la viabilidad celular) y de muerte celular apoptótica de linfocitos humanos aislados *in vitro* a diferentes concentraciones, mostrando una relación concentración-dependiente.

La reducción en el índice mitótico (IM) refleja una inhibición del proceso del ciclo celular y/o pérdida de la capacidad proliferativa, fenómeno posiblemente causado por muerte celular o apoptosis. La reducción en la viabilidad celular sugiere que la mezcla compleja de solventes orgánicos contenida en el tiner, a las concentraciones evaluadas en este estudio, interactúa con estructuras celulares de los linfocitos de importancia biológica para la homeostasis celular, siendo el blanco principal la membrana celular, la cual puede ser alterada en su funcionalidad, estructura y permeabilidad.

El incremento de la muerte celular (apoptótica y necrótica) dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento de los linfocitos al tiner puede explicarse por un aumento de las especies reactivas de oxígeno formadas por los diferentes químicos presentes en esta mezcla compleja. Mientras que el efecto apoptótico inducido, posiblemente está asociado con daño oxidativo (especies reactivas de oxígeno y radicales libres) del material genético y/o por desregulación en la homeostasis de las concentraciones del calcio intracelular ( $\text{Ca}^{+2}$ ).

## **11. IMPACTO**

Al divulgar estos resultados se busca alertar a la comunidad sobre los efectos adversos que se pueden presentar por el uso continuo e inadecuado de este solvente y motivar a la prevención por medio de la implementación de medidas de protección personal y/o reducción del uso del tñner. Con los resultados obtenidos en este estudio, se espera hacer un aporte importante al conocimiento científico del efecto citotóxico y apoptótico del tñner debido a su gran uso en los hogares y por trabajadores del sector informal de pinturas sin ningún tipo de normas de bioseguridad.

## 12. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una interacción directa de los componentes del tiner con estructuras básicas de los linfocitos humanos, se hace necesario realizar más estudios sobre el efecto apoptótico de mezclas complejas de solventes orgánicos como el tiner, que permiten determinar el mecanismo de activación de la muerte celular apoptótica inducida por este tipo de químicos.

Sería conveniente realizar estudios del efecto apoptótico de cada uno de los componentes del tiner por separado, para identificar cuáles son los inductores del proceso apoptótico que interactúan principalmente con proteínas específicas de membrana y de esta forma identificar los mecanismos específicos de toxicidad.

Para futuros estudios, sería pertinente evaluar el efecto apoptótico del tiner en líneas celulares provenientes del cerebro, hígado y riñón ya que diversos estudios demuestran que las células de estos órganos son el blanco principal de los solventes orgánicos.

Debido a que existe una estrecha relación entre el desencadenamiento del proceso apoptótico y fallas en el proceso de reparación de los daños inducidos en el DNA, sería conveniente direccionar futuros estudios sobre la respuesta apoptótica de linfocitos polimórficos para las diferentes enzimas de reparación y biotransformación de xenobióticos.

## BIBLIOGRAFIA

1. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Methylene Chloride. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR (1991a). Draft for public comment.
2. \_\_\_\_\_. Toxicological Profile for Styrene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR (1992e). TP-91/25.
3. \_\_\_\_\_. Toxicological Profile for 1,2-Dichloroethane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR (1992h). Draft for public comment.
4. \_\_\_\_\_. Toxicological Profile for Chloromethane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR (1990c). TP-90/07.
5. AL-GHAMDI, S.S., RAFTERY, M.J., YAQOOB, M.M. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P450E1 causes proximal tubular necrosis by oxidative stress. En: Toxicol. In Vitro. Vol. 17 (2003); p. 335–341.
6. ALGUACIL, J., *et al.* Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. En: Carcinogenesis. Vol. 23 (2002); p. 101-106.
7. AMSTAD, P., MORET, R. y CERUTTI, P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. En: J. Biol. Chem. Vol. 269 (1994); p. 1606-1609.
8. ANDERSEN, M. E. y BARTON, H. A. The use of biochemical and molecular parameters to estimate dose–response relationships at low levels of exposure. En: Environmental health perspectives. Vol. 106 (1998); p. 349-355, citado por SWEET, L., *et al.* Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. En: Biomarkers. Vol. 4, No. 4 (1999); p. 237–253.
9. ANDERSON, BE., ZEIGER, E., SHELBY, MD., *et al.* Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. En: Environ. Mol. Mutagen. Vol. 16, No. 18 (1990); p. 55–137.
10. ARLIEN-SØBORG P., *et al.* Report on a conference on organic solvents and the nervous system. En: Neurotoxicol. Teratol. Vol. 14 (1992); p. 81–82.
11. AXELSON, O. y HOGSTEDT, C. The health effects of solvents. En: Zenz C, editor. Occupational Medicine. 3ª edición. San Luis: Editorial Mosby; (1994). p. 764-778.

12. BAELUM, J., ANDERSEN, I., MØLLHAVE, L. Acute and subacute symptoms among workers in the printing industry. En: Br. J. Ind. Med. Vol. 39 (1982); p. 70–75.
  
13. BAKAND, S., *et al.*. A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. En: J. Environ. Monit. Vol. 8 (2006); p. 100–105.
  
14. BAUCHINGER, M., *et al.* Chromosome change in lymphocytes after occupational exposure to toluene. En: Mutation research. Vol. 102 (1982); p. 439-445, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Toxicological review of toluene. (2005); p. 53-57.
  
15. BECTON DICKINSON IMMUNOCYTOMETRY SYSTEMS. FACS Training Manual. Modulos: 1, 5-6. (1995).
  
16. BENDER, M.A., GRIGGS, H.G. y WALKER, P.L. Mechanisms of chromosomal aberration production. I. Aberration induction by ultraviolet light. En: Mutation research. Vol. 20, No. 3 (1973); p. 387-402.
  
17. BEVING, H., TORNLING, G., OLSSON, P. Increased erythrocyte volume in car repair painters and car mechanics. En: Br. J. Ind. Med. Vol. 48 (1991); p. 499–501.
  
18. BLAIR, A., *et al.* 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.
  
19. BOERSMA, A. *et al.* Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. En: Cytometry. Vol. 24 (1996); p. 123-130.
  
20. BONNER, W.A. y HERZENBERG, L.A. Fluorescence Activated Cell Sorting. En: The Review of Scientific Instruments. Vol. 43, No. 3 (1972); p. 404-409.
  
21. BRAUTBAR, N., 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.
  
22. BROWN-WOODMAN, P. *et al.* Assessment of interactive effects of the aromatic hydrocarbons toluene, xylene and benzene on rat embryonic development in vitro. En: Teratology. Vol 45, No 3 (1992); p. 326, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbencene and xylenes (BTEX). (2004); p. 6.
  
23. BUZIO, L., *et al.* Occupational risk factors for renal cell cancer: An Italian case-control study. En: Med. Lav. Vol. 93 (2002); p. 303–309.

24. CALDERÓN-GUZMÁN, D., *et al.* Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in adult rat brain. En: Neurochem. Res. Vol. 30 (2005); p. 619–624.
25. CARBONARI, M., CIBATI, M., FIORILLI, M. Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. En: Cytometry. Vol. 22, No. 3 (1995); p. 161-167.
26. CÁRDENAS-BUSTAMANTE, O., *et al.* Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá. En: Rev. Salud pública. Vol. 9, No. 2 (2007); p. 275-288.
27. CLEMEDSON, C., *et al.* MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays. En: Alternatives to Laboratory Animals. Vol. 28, Suplemento 1 (2000); p. 161–200.
28. COLE, J., SKOPEK, T.R. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Working paper no. 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. En: Mutation Research. Vol. 304, No. 1 (1994); p. 33-105.
29. COSKUN, O., *et al.* The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. En: Neurochem. Res. Vol. 30 (2005); p. 33–38.
30. COSTA, C. *et al.*, In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. En: Toxicology in Vitro. Vol. 20 (2006). p. 324–331.
31. CRANMER, GOLDBERG. Human aspects of solvent neurobehavioral effects. Report of the workshop session on clinical and epidemiological topics. En: Neurotoxicology. Vol. 7 (1987); p. 45–56.
32. CROUTE, F., *et al.* Evaluation of the cytotoxic threshold of benzene and its chlorinated derivatives and related stress protein expression (Hsp72, Hsp90 and Grp78) in human cell in vitro. En: Fresenius Environ. Bull. Vol. 9 (2000); p. 373–380.
33. CURTIN, J.F., DONOVAN, M., COTTER, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. En: Journal of Immunological Methods. Vol. 265 (2002); p. 49-72.
34. CZENE, S.M., TIBAË, C.K., HARMS-RINGDAHL, M. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. En: Biochem. J. Vol. 323 (1997); p. 337-341.
35. DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis) En: Cytometry. Vol. 27 (1997); p. 1-20.

36. DAVILA, J *et al.* Predictive Value of *In Vitro* Model Systems in Toxicology. En: Annual review of pharmacology and toxicology. Vol. 38 (1998); p. 63-96, citado por MCDERMOTT, Catherine *et al.* Validation of a method for acute and subchronic exposure of cells in vitro to volatile organic solvents. En: Toxicology *in vitro*. (2006); p. 3.
37. DÍAZ, H., *et al.* Evaluación de la exposición ocupacional a solventes en trabajadores de una fábrica de calzado. En: Rev. Cubana Hig. Epidemiol. Vol. 37, No. 3 (1999); p. 114-121.
38. DIMMELER, S., *et al.* Nitric oxide inhibits APO-1/Fas-mediated cell death. En: Cell Growth Differ. Vol. 9 (1998); p. 415-422.
39. DIVE, C., *et al.* Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. En: Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1133 (1992); p. 275–285.
40. DOBROKHOTOV, V., ENIKEEV, M. The mutagenic action of benzene, toluene and a mixture of these hydrocarbons in a chronic test. En: Gig. Sanit. Vol. 2, No 1 (1977); p. 32-34, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Toxicological review of toluene. <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>. (2005); p. 53-57.
41. DREIEM, A., MYHRE, O., FONNUM, F. Relationship between lipophilicity of C6–10 hydrocarbon solvents and their ROS-Inducing otency in rat cerebellar granule cells. En: NeuroToxicology. Vol. 23 (2002); p. 701–709.
42. DREIEM, A., RING, A., FONNUM, F. Organic solvent-induced cell death in rat cerebellar granule cells: Structure dependence of C10 hydrocarbons and relationship to reactive oxygen species formation. En: NeuroToxicology. Vol. 26 (2005); p. 321–330
43. ENGELKE, M., TAHTI, H., VAALAVIRTA, L. Perturbation of artificial and biological membranes by organic compounds of aliphatic, alicyclic and aromatic structure. En: Toxicology in vitro. Vol. 10, No. 2 (abr. 1996); p. 111-115.
44. EISENBRAND, G. *et al.* Methods of in vitro toxicology. En: Food and chemical toxicology. Vol. 40 (2002); p. 193-236.
45. EKWALL, B., *et al.* MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VI. Prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 in vitro tests. En: Alternatives to Laboratory Animals. Vol. 26, Suplemento 2 (1998); p. 617–658.
46. FADOK, V.A., *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. En: J Immunol. Vol. 148 (1992); p. 2207–2216.

47. FARRIS, G.M., *et al.* Effects of benzene on splenic, thymic and femoral lymphocytes in mice. En: Toxicology 118 (1997); p.137–148.
48. FLEISHER, T.A. Apoptosis. En: Ann. Allergy Asthma Immunol. Vol. 78, No. 3 (1997); p. 245-249.
49. FORNI, A., *et al.* Chromosome studies in workers exposed to benzene or toluene or both. En: Arch Environ Health. Vol. 22 (1971); p. 373-378, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Toxicological review of toluene. <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>. (2005); p. 53.
50. FUNES-CRAVIOTA, F., *et al.* Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in workers in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. En: Lancet. Vol. 2 (1977); p. 322-325, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Toxicological review of toluene. <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>. (2005); p. 53.
51. GERNER-SMIDT, P., FRIEDRICH, U. The mutagenic effect of benzene, toluene, and xylene studied by the SCE technique. En: Mutation Research. Vol. 58 (1978); p. 313–316.
52. GOLD, L y AMES, BN. Too many rodent carcinogens. En: Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. Vol. 87 (1990); p. 7772-7776.
53. GOMEZ-LECHON, M.J., O’CONNOR, E., CASTELL, J.V. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. En: Toxicological Sciences. Vol. 65, No. 2 (2002); p. 299– 308.
54. GONZALEZ, R. J., TARLOFF, J. B.. Expression and activities of several drug metabolizing enzymes in LLC-PK1 cells. En: Toxicology in vitro. Vol. 18 (2004); p. 887-894.
55. GUPTA, B.N., KUMAR, P., SRIVASTAVA, A.K. An investigation of the neurobehavioural effects on workers exposed to organic solvents. En: J. Soc. Occup. Med. Vol. 40 (1990); p. 94-96.
56. GUTIÉRREZ-FLORES, R.R. Solventes industriales. En: Cuadernos Científicos CEMEF. Vol. 2 (1975); p. 35-48.
57. HAGEMAN, G., *et al.* Parkinsonism, pyramidal signs, polyneuropathy, and cognitive decline after long-term occupational solvent exposure. En: J. Neurol. Vol. 246 (1999); p. 198–206.

58. HAGLUND, U; LUNDBERG, I; ZECH, L. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Swedish paint industry workers. En: Scand J Environ Health. Vol. 6 (1980); p. 291-298, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Toxicological review of toluene. <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>. (2005);p. 54.
59. HALLE, W. The registry of cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals. En: Alternatives to Laboratory Animals. Vol. 31 (2003); p. 89–198.
60. HASMALL, S. y ROBERTS, R. The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics. En: Pharmacol. Ther. Vol. 82, No. 1 (1999); p. 63-70.
61. HAYES, R.B., *et al.* Mortality among benzene-exposed workers in China. En: Environ. Health Perspect. Vol. 104 suppl 6 (1996); p. 1349-1352, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 2
62. HENEGARIU, O. *et al.* Improvements in cytogenetic slide preparation: Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. En: Cytometry. Vol. 43 (2001); p. 101-109.
63. HERNÁNDEZ-AVILA, M., GARRIDO-LATORRE, F., LÓPEZ-MORENO, S. Diseño de estudios epidemiológicos. En: Salud pública de México. Vol. 42, No. 2 (2000); p. 144-154.
64. HERTVELDT, J *et al.* Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis *in vitro* in human peripheral blood lymphocytes. En: Int. J. Radiat. Biol. Vol. 71, No. 4 (1997); p. 429-433.
65. HIDALGO, V., LONDOÑO, E. Daño genético y/o apoptótico inducido *in vitro* por el tñner (mezcla de solventes orgánicos) en linfocitos humanos de sangre periférica, evaluado a través del ensayo cometa alcalino. Popayán, (2007), 98 p. Tesis (biólogo): Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, exactas y de la educación.
66. HIRAKU, Y., KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. En: Cancer research. Vol. 56, No. 22 (1996); p. 5172-5178.
67. HOLZ O., *et al.* Determination of low level exposure to volatile aromatic hydrocarbons and genotoxic effects in workers at a styrene plant. En: Environ Med. Vol. 52, No. 6 (1995); p. 420-428, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 65-76.

68. 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.
69. HOYOS, L.S, CAJAS, y CARVAJAL, S. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. (2002). p. 23-24.
70. HSIEH, G.C., *et al.* Immunotoxicological evaluation of toluene exposure via drinking water in mice. En: Environ. Res. Vol. 49 (1989); p. 93–96.
71. IBUKI, Y. Y GOTO, R. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. En: Biochimica et biophysica acta-Molecular basis of disease. Vol. 1690, No 1 (2004); p. 11-21.
72. IKEDA, N., *et al.* The course of respiration and circulation in toluene sniffing. En: Forensic Sci. Int. Vol. 44 (1990); p. 151-158.
73. INTEGRATED RISK INFORMATION SYTEM (IRIS). Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes. U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>. 2001, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 3
74. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some industrial chemicals. En: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 77 (2000); citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 2.
75. \_\_\_\_\_. Wood, leather and some associated industries. Lyon, France. IARC Monographies evaluation of carcinogens risk humans. Vol. 25. (1981).
76. \_\_\_\_\_. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. Lyon, France. IARC Monographies evaluation of carcinogens risk humans. Vol. 63. (1995).
77. \_\_\_\_\_. Benzene Group 1: A. Evidence for carcinogenicity to humans (sufficient). En: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations carcinogenicity: An updating of IARC monographs. Vol. 1-42 (1987), citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 3.

78. \_\_\_\_\_. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Toluene. En: Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine, and hydrogen peroxide. Vol. 71 part two (1999a); p. 829-864, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 5
79. \_\_\_\_\_. Some industrial chemicals. Ethylbenzene. En: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 77. (2000); p. 227-266, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 4
80. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Xylenes. En: Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine, and hydrogen peroxide. Vol. 71 part three (1999b); p. 1189-1208, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). (2004); p. 5
81. \_\_\_\_\_. Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting. En: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 47 (1989); p. 125–156.
82. JUNTUNEN, J. Neurotoxic syndromes and occupational exposure to solvents. En: Environ. Res. Vol. 60 (1993); p. 98–111.
83. KAM, P.C.A., FERCH, N.I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. En: Anaesthesia. Vol. 55 (2000); p. 1081-1093.
84. KAUPPINEN, T., *et al.* A pancreatic cancer and occupational exposure. En: Epidemiology. Vol. 6 (1995); p. 498-502.
85. KOOPMAN G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells under going apoptosis. En: Blood. Vol. 84 (1994); p. 1415-1420.
86. KUKULL, W.A., *et al.* Solvent exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: a case-control study. En: Am. J. Epidemiol. Vol. 141 (1995); p. 1059–1071.
87. KURKNER, A., *et al.* The effect of xylene inhalation on the rat liver. En: Acta Physiol. Hung. Vol. 85 (1997); p. 231–241.
88. LANDTBLOM, A.M., *et al.* Organic solvents and multiple sclerosis: a synthesis of the current evidence. En: Epidemiology. Vol. 7 (1996); p. 429–433.

89. LENNON, S.V., MARTIN, S.J., COTTER, T.G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. En: Cell Proliferation. Vol. 24, No 2 (1991); p. 203–214.
90. LYNGE, E., ANTTILA, A., HEMMINKI K. Organic solvents and cancer. En: Cancer Causes and Control. Vol. 8 (1997); p. 406-419.
91. M'BEMBA-MEKA, P., LEMIEUX, N. y CHAKRABARTI, S.K. Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in human lymphocyte death induced by nickel carbonate hydroxide *in vitro*. En: Arch. Toxicol. Vol. 80 (2006); p. 405–420.
92. MAKI-PAKKANEN, J., *et al.* Toluene-exposed workers and chromosome aberrations. En: Journal Toxicol Environ Health. Vol. 6 (1980); p. 775-781, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Toxicological review of toluene. <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>. (2005); p. 53.
93. MARTINEZ-VELAZQUEZ, M., *et al.* Benzene metabolites induce apoptosis in lymphocytes. En: Exp. Toxicol. Pathol. Vol. 58, No. 1 (2006); p. 65-70
94. MATES, J.M., SANCHEZ-JIMENEZ, F.M.. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. En: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Vol. 32 (2000); p. 157-170.
95. MATTIA, C.J., ADAMS, J.D. Jr, BONDY, S.C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 46 (1993); p. 103–110.
96. MATTIA, C.J., ALI, S.F., BONDY, S.C. Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. En: Mol. Chem. Neuropathol. Vol. 18 (1993); p. 313–328.
97. MATTIA, C.J., LEBEL, C.P., BONDY, S.C. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 42 (1991); p. 879–882.
98. MAYOR, J., *et al.* Estudio de los efectos sobre el sistema nervioso de la exposición potencial a solventes orgánicos. Bogotá. Instituto de Seguros Sociales. (1998).
99. McDERMOTT, C., *et al.* Sub-chronic toxicity of low concentrations of industrial volatile organic pollutants *in vitro*. En: Toxicol. And Appl. Pharmacol. Vol. 219 (2007); p. 85-94

100. \_\_\_\_\_. *In vitro* exposure of Jurkat T-cells to industrially important organic solvents in binary combination: Interaction analysis. En: Toxicological Sciences. Vol. 101, No 2 (2008); p. 263-274.
101. MERINO, M., *et al.* estudio IN SITU de la influencia del dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la permeabilidad intestinal del saquinavir. En: Biofarmacia y farmacocinética. (2001); p. 7-9.
102. MINEAU, P. Biomarkers: are there linkages to ecological effects?. En: Multiple stresses in ecosystems. J. J. Cech, Jr, B. W. Wilson, and D. G. Crosby, eds (Boca Raton FL: Lewis Publishers). (1998); 91-99, citado por SWEET, L., *et al.* Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. En: Biomarkers. Vol 4, No. 4 (1999); p. 237–253.
103. MOEN, B.E., HOLLUND, B.E. Exposure to organic solvents among car painters in Bergen, Norway. En: Ann. Occu. Hyg. Vol. 44 (2000); p. 185–189.
104. MOHTASHAMIPUR, E., NORPOTH, K., WOELKE, U., *et al.* 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.
105. MOLVEN, A., GOKSØYR, A. Biological effects and biomonitoring of organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. En: Ecotoxicology Monitoring, M. Richardson, ed. (New York: VCH Publishers), (1993). p. 137–162.
106. MORAN, JL., *et al.* Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. En: molecular pharmacology. Vol. 50, No. 3 (1996); p. 610-615.
107. MORATA, T.C., *et al.* Toluene-induced hearing loss among rotogravure printing workers. En: Scand. J. Work Environ. Health. Vol. 23 (1997); p. 289–298.
108. MORENO, E., CUELLAR, C. Y DUEÑAS, A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. En: Revista del Instituto Nacional de cancerología. Vol. 46, No. 4 (2000); p. 275-280.
109. MOROZZI, G., *et al.* Induction of DNA-damage and apoptosis by volatile organic compounds and by benzene metabolites. En: Igiene moderna. Vol. 112, No. 4 (1999); p. 1503-1513.
110. MYHRE, O., *et al.* The effects of aliphatic (n-nonane), naphthenic (1,2,4-trimethylcyclohexane), and aromatic (1,2,4-trimethylbenzene) hydrocarbons on respiratory burst in human neutrophil granulocytes. En: Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 167 (2000); p. 222–230.

111. MYHRE, O., *et al.* Effects of the solvent 1,2,4-trimethylcyclohexane on respiratory burst in human neutrophil granulocytes. A chemiluminescence and electron paramagnetic resonance spectrometry study. En: Ann. New York Acad. Sci. Vol. 893 (1999); p. 358-361.
112. MYHRE, O., FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 62 (2001); p. 119–128.
113. NARAYANAN, S., O'DONOVAN, M.R., DUTHIE S.J. Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes. En: Mutagenesis. vol. 16, No 6 (2001); p. 455-459.
114. NATL. RES. COUNC. Biological Markers in Immunotoxicology. Washington, DC: Natl. Acad. Press. (1989); 206 p.
115. NATL. RES. COUNC. COMM. BIOL. MARKERS. Biological markers in environmental health research. En: Environ. Health Perspect. Vol. 74 (1987); p.3-9
116. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Ninth report on carcinogens. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. <http://ehis.niehs.nih.gov/roc/toc9.html>. 2001, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Op. cit., (2004); p. 1-7.
117. NGUYEN, H.N., WANG, C., PERRY, D.C. Depletion of intracellular calcium stores is toxic to SH-SY5Y neuronal cells. En: Brain research. Vol. 924 (2002); p. 159-166.
118. NIKLASSON, M., *et al.* Audiological disturbances caused by long-term exposure to industrial solvents. Relation to the diagnosis of toxic encephalopathy. En: Scand. Audiol. Vol. 27 (1998); p. 131–136.
119. NIÑO, R., CAMARGO, J. Caracterización del thinner para la industria de pinturas de uso domestico, en SantaFé de Bogotá D.C durante 1999, por cromatografía de gases. Bogotá, (1999), 70 p. Tesis (quimico): Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias.
120. NORPPA H., *et al.* Induction of sister-chromatid exchanges by styrene analogues in cultured human lymphocytes. En: Mutation research. Vol. 116 (1983); p. 379-387, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Op. cit., (2004); p. 72-74.
121. ORMEROD, M.G., CHEETHAM, F.P.M. y SUN, X.M. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. En: Cytometry. Vol. 21 (1995); p. 300–304.

122. PALERMO-NETO, J., *et al.* Glue solvent inhalation impairs host resistance to *Mycobacterium bovis* induced infection in hamsters. En: *Vet. Hum. Toxicol.* Vol. 43 (2001); p. 1–5.
123. PAP, M., VARGA, C. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of workers occupationally exposed to xylene. En: *Mutation Research.* Vol. 187 (1987); p. 223–225.
124. PEAKALL, D., *Animal Biomarkers as Pollution Indicators.* (London: Chapman and Hall) (1992); p. 204-205, citado por SWEET, L., *et al.* Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. En: *Biomarkers.* Vol. 4, No. 4 (1999); p. 237–253.
125. PELKONEN, O., RAUNIO, H. Individual expression of carcinogen metabolizing enzymes: Cytochrome P4502A. En: *J. Occup. Environ. Med.* Vol. 37 (1995); p. 19–24.
126. PEÑA, G.E., *et al.* Evaluación epidemiológica de la exposición a solventes orgánicos en fábricas de pinturas y pegantes en Bogotá. Instituto Nacional de Salud, Seguro Social. (1996); p. 1-28.
127. PERERA, F.P. y WHYATT, R.M. Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. En: *Mutation Research.* Vol. 313, No. 2-3 (Oct-Dec, 1994); 117-129.
128. PINTO, D., CEBALLOS, J., GARCIA, G. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. En: *J. Urol.* Vol. 467 (2000); p. 105-111.
129. PISCOYA, J. Toxicidad de los solventes como riesgo ocupacional. En: *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna.* Vol. 13, No. 1 (2000).
130. PITARQUE, M., *et al.* Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. En: *Mutation research.* Vol. 441 (1999); p. 115-127.
131. RANALDI, G., ISLAM, K., SAMBUY, Y. Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. En: *Antimicrobial Agents chemother.* Vol. 36 (1992); p. 1374-1381.
132. REGO, M., *et al.* Non-Hodgkin's lymphomas and organic solvents. En: *J. Occup. Environ. Med.* Vol. 44 (2002); p. 874-881.
133. REVILLA, A., *et al.* Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial Uncoupling. En: *Toxicology in Vitro.* Vol. 21 (2007); p. 782–788.

134. REPETTO, M. Toxicología de la drogadicción. Madrid-Barcelona: Editorial Diaz De Santos S.A., (1985).
135. RICHER, C., *et al.* 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, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Op. cit. (2005); p. 55.
136. ROJAS, E., *et al.* Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. En: Anticancer Drugs. Vol. 4, No. 6 (1993); p. 637-640.
137. ROOS, W.P., KAINA, B. Dna damage-induced cell death by apoptosis. En: Trends in Molecular medicine. Vol. 12, No. 9 (2006); p. 440-448.
138. SALGADO, M. Citometría de flujo. Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA. (2002). p. 5-17.
139. SALZMAN GC, *et al.* Light scattering and cytometry. En: Flow Cytometry and Sorting, Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (eds). Wiley-Liss, New York, (1990); p. 81-107.
140. SCHREVEENS A., VAN NASSAUW L. y HARRISSON F. Histochemical demonstration of apoptotic cells in the chicken embryo using annexin V. En: Histochemical Journal. Vol. 30 (1998); p. 917-922.
141. SEEDORFF L., y OLSEN E. Exposure to organic solvents--I. A survey on the use of solvents. En: The annals of occupational hygiene. Vol. 34, No. 4 (1990); p. 371-378.
142. SEMPLE, S., *et al.* Impairment of colour vision in workers exposed to organic solvents. En: Occup. Environ. Med. Vol. 57 (2000); p. 582-587.
143. SGONC, R. y GRUBER, J. Apoptosis Detection: An Overview. En: Experimental Gerontology, Vol. 33, No. 6 (1998); p. 525-533.
144. SIEMIATYCHI, J. Risk factors for cáncer in the workplace. Boca raton, Florida USA: CRC Press, (2007); p. 1-325.
145. SIKKEMA, J., DE BONT, J. y POOLMANN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. En: The journal of biological chemistry. Vol. 269, No 11 (1994); p. 8022-8028.
146. SINGH, N.P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. En: Experimental cell research. Vol. 256, No. 1 (2000); p. 328-337.

147. SMARGIASSI, A., *et al.* A case-control study of occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease in the Emilia-Romagna region of Italy. En: Neurotoxicology. Vol. 19 (1998); p. 709–712.
148. SNYDER, R., WITZ, G., GOLDSTEIN, B.D. The toxicology of benzene. En: Environ. Health Perspect. Vol. 100 (1993); p. 293-306.
149. SNYDER, R.S., ANDREWS, L.S., Toxic effects of solvents and vapors. En: Klassen\_s Casarett and Doulls Toxicology, fifth ed. McGraw-Hill. USA. (1996).
150. STRASSER, A., *et al.* DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. En: cell. Vol. 79, No. 2 (1994); p. 329-339.
151. SWAT, W., IGNATOWICZ, L., KISIELOW, P. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. En: J. Immunol. Meth. Vol. 137 (1981); p. 79–87.
152. SWEET, L. I., *et al.* Fish thymocyte viability, apoptosis and necrosis: in-vitro effects of organochlorine contaminants. En: Fish & Shell. Immunology, Vol. 8 (1998); p 77–90.
153. TAMARIT, J., CABISCOL, E., y ROS, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stress. En: J. Biol. Chem. Vol. 273 (1998); p. 3027-3032.
154. TULINSKA, J., *et al.* Changes in cellular immunity among workers occupationally exposed to styrene in a plastics lamination plant. En: Am. J. Ind. Med. Vol. 38 (2000); p. 576–583.
155. TUSCHL, H. y SCHWAB, C.E. The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing. En: Toxicology in Vitro. Vol. 19 (2005); p. 845–852.
156. URBAN, B.W. Current assessment of targets and theories of anaesthesia. En: Br. J. Anaesth. Vol. 89 (2004); p. 167–183.
157. VAN ENGELAND, M. *et al.* Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. En: Cytometry. Vol. 31 (1998); p. 1-9.
158. VANACORE, N., *et al.* A possible association between exposure to n-hexane and parkinsonism. En: Neurol. Sci. Vol. 21 (2000); p. 49–52.
159. VAUX, D. L. Apoptosis and toxicology-what relevance?. En: Toxicology. Vol. 181-182 (2002); p. 3-7.

160. WANG, J.D., CHEN, J.D. Acute and chronic neurological symptoms among paint workers exposed to mixtures of organic solvents. En: Environ. Res. Vol. 61 (1993); p. 107–116.
161. WASHINGTON, WJ., MURTHY, RC., DOYE, A., *et al.* Induction of morphologically abnormal sperm in rats exposed to o-xylene. En: Arch Andrology. Vol. 11 (1983); p. 233–237.
162. WICHMANN, G., *et al.* An experimental model for the determination of immunomodulating effects by volatile compounds. En: Toxicol. In Vitro. Vol. 19 (2005); p. 685–693.
163. WILLINGHAM M. Cytochemical methods for the detection of apoptósis. En: The journal of histochemistry and cytochemistry. Vol. 47, No 9 (1999); p.1101-1109.
164. WIRLEITNER, B., *et al.* 7,8- Dihydroneopterin-induced apoptosis in jurkat T lymphocytes: A comparison with anti-fas and hydrogen peroxide-mediated cell death. En: Biochemical pharmacology. Vol. 56 (1998); p. 1181-1187.
165. YIN, S.N., *et al.* An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. Benzene Study Group. En: Am. J. Ind. Med. Vol. 29 (1996); p. 227-235, citado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Op. cit., (2004); p. 1-7.
166. ZAPOR, L., SKOWRON, J y GOLOFIT-SZYMCZAK, M. The cytotoxicity of some organic solvents on isolated hepatocytes in monolayer cultures. En: International journal of occupational safety and ergonomics. Vol. 8, No 1 (2002); p. 121-129, citado por MCDERMOTT, Catherine *et al.*, op cit. (2006); p. 3.
167. ZAVALIC, M., *et al.* Assessment of colour vision impairment in male workers exposed to toluene generally above occupational exposure limits. En: Occup. Med. Vol. 48 (1998); p. 175–80.
168. ZHU, C., LAM, T., JIANG, C. Lymphocyte dna damage in bus manufacturing workers. En: J. Urol. Vol. 491 (2001); p. 173-181.