

IDENTIFICACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE UN  
SUBPRODUCTO DE LA DESINFECCIÓN DEL AGUA (ÁCIDO IODOACÉTICO),  
EVALUADAS MEDIANTE EL ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR Y LA  
FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS CON LA ASOCIACIÓN AL POLIMORFISMO  
DEL GEN GSTM1, EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

IVAN FELIPE GUERRERO FERNANDEZ  
JOHN ALEXANDER VELASCO GÓMEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
ENFASIS EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA  
POPAYÁN  
2013

IDENTIFICACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE UN  
SUBPRODUCTO DE LA DESINFECCIÓN DEL AGUA (ÁCIDO IODOACÉTICO),  
EVALUADAS MEDIANTE EL ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR Y LA  
FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS CON LA ASOCIACIÓN AL POLIMORFISMO  
DEL GEN GSTM1, EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

IVAN FELIPE GUERRERO FERNANDEZ  
JOHN ALEXANDER VELASCO GÓMEZ

Trabajo de grado para optar el título de Biólogo

Director (a)

PH.D. NOHELIA CAJAS SALAZAR  
Profesora de la Universidad del Cauca

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
ENFASIS EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA  
POPAYÁN  
2013

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>14</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
3.1 SUBPRODUCTOS DE LA DECONTAMINACIÓN DEL AGUA .....	<b>20</b>
3.2 METABOLISMO Y BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIOTICOS .....	<b>22</b>
3.3 GLUTATION S-TRANSFERASA .....	<b>23</b>
3.4 ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR (IDN).....	<b>24</b>
3.5 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.....	<b>24</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	<b>30</b>
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>30</b>
<b>6. HIPOTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	<b>32</b>
7.1 DONANTES DE SANGRE .....	<b>32</b>
7.2 GENOTIPIFICACIÓN.....	<b>32</b>
7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	<b>32</b>
7.4 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.....	<b>33</b>
7.4.1 Cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica .....	<b>34</b>

7.4.2	Tratamiento agudo con IAA .....	34
7.4.3	Cosecha de linfocitos tratados con IAA.....	35
7.4.4	Índice de división nuclear (IDN) .....	36
7.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	36
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
8.1	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD .....	37
8.2	ENSAYO DE GENOTOXICIDAD .....	38
8.3	MODULACIÓN DEL POLIMORFISMO EN EL GEN GSTM1 SOBRE EL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA .....	40
8.3.1	Modulación del polimorfismo en el gen gstm1 sobre el efecto citotóxico .....	40
8.3.2	Modulación del polimorfismo en el gen gstm1 sobre el efecto genotóxico .....	42
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
9.1	EFECTO CITOTÓXICO .....	46
9.2	EFECTO GENOTÓXICO .....	48
9.3	MODULACIÓN DEL GEN GSTM1.....	52
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>11.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
<b>FIGURA 1:</b> Producción de ácidos haloacéticos .....	<b>21</b>
<b>FIGURA 2:</b> Ácidos haloacéticos .....	<b>21</b>
<b>FIGURA 3:</b> Formación de MN .....	<b>25</b>
<b>FIGURA 4:</b> Posibles mecanismos de formación de los MN .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 5:</b> Línea de tiempo del protocolo de micronúcleos con DBPs .....	<b>34</b>
<b>FIGURA 6:</b> Curva de mejor ajuste que explica la asociación lineal negativa, de la citotoxicidad, con un 95% de confianza .....	<b>38</b>
<b>FIGURA 7:</b> Curva de mejor ajuste que explica la asociación lineal positiva, de la genotoxicidad, con un 95% de confianza. ....	<b>40</b>
<b>FIGURA 8:</b> Modulación del gen GSTM1 sobre el efecto citotóxico en linfocitos de sangre periférica tratados con IAA. ....	<b>41</b>
<b>FIGURA 9:</b> Modulación del gen GSTM1 sobre el efecto genotóxico en linfocitos de sangre periférica tratados con IAA.....	<b>43</b>
<b>FIGURA 10:</b> Registro fotográfico de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis, observados al microscopio óptico (100X) .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
<b>TABLA 1:</b> Diseño experimental .....	<b>33</b>
<b>TABLA 2:</b> Índice de División Nuclear en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con IAA (media $\pm$ D.S). .....	<b>37</b>
<b>TABLA 3:</b> Frecuencia de MN en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con IAA (media $\pm$ D.S). .....	<b>39</b>
<b>TABLA 4:</b> Índice de división nuclear en linfocitos humanos de sangre periférica con relación a los genotipos GSTM1 tratados con IAA (media $\pm$ D.S). .....	<b>41</b>
<b>TABLA 5:</b> Frecuencia de MN en linfocitos humanos de sangre periférica y su relación con los genotipos GSTM1 (media $\pm$ D.S). .....	<b>42</b>

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pag.</b>
<b>Anexo A:</b> Consentimiento informado.....	<b>64</b>
<b>Anexo B:</b> Encuesta .....	<b>67</b>

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

Ph.D. Nohelia Cajas Salazar

Jurado \_\_\_\_\_

Bióloga Elizabeth Londoño

Jurado \_\_\_\_\_

Bióloga Diana Saavedra

Popayán, 06 de mayo de 2013



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por regalarnos salud, fortaleza y la oportunidad de culminar con éxito nuestra etapa universitaria.

A nuestros padres Rosibel Fernández, Melvi Gómez y James Velasco, por brindarnos apoyo, amor e inculcarnos cada día valores para nuestra formación personal y académica.

A Silvio Carvajal Mg. por brindarnos amablemente su conocimiento científico y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A Luz Stella Hoyos Ph.D, por su profesionalismo e inspirar el amor y la dedicación por nuestra carrera.

A Nohelia Cajas Ph.D, por su dedicación y exigencia para llevar a término este proyecto.

Al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética por su colaboración y aporte en nuestra formación profesional; especialmente a las Biólogas Elizabeth Londoño, Ingrid Reyes y Diana Saavedra.

A nuestros profesores, compañeros y amigos, por brindarnos su conocimiento, amistad y apoyo.

## RESUMEN

Los ácidos haloacéticos (HAAs) son la segunda clase más común de subproductos de la desinfección del agua potable (DBPs) y su presencia en el agua se ha convertido en un problema de salud pública, debido a sus posibles efectos genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. El ácido iodoacético (IAA), ha demostrado ser uno de los HAAs más dañinos a nivel celular, y en el presente estudio se evaluó *in vitro* sus efectos citotóxicos y genotóxicos, utilizando como biomarcadores el Índice de División Nuclear (IDN) y la Frecuencia de Micronúcleos (MN), respectivamente, en linfocitos humanos de sangre periférica. Además se evaluó el efecto modulador del polimorfismo del gen *GSTM1*, implicado en el metabolismo de los subproductos de la desinfección del agua. Los linfocitos fueron colectados de dos individuos con genotipos *GSTM1+* y *GSTM1-*, previamente determinados mediante PCR. Se tomaron muestras de sangre de estos 2 individuos para realizar los cultivos de linfocitos, y ser tratados con las concentraciones baja media y alta del IAA y los controles positivo y negativo, cada uno con sus respectivos duplicados. Los resultados de nuestro estudio evidencian la capacidad del IAA para disminuir el IDN ( $p=0,001$ ) e inducir la formación de MN ( $p=0,001$ ) en las tres concentraciones evaluadas, lo que se asoció con un efecto citotóxico y genotóxico adverso respectivamente. Con relación al efecto modulador del polimorfismo del gen *GSTM1* sobre el IDN, no se observó diferencia significativa ( $p= 0,564$ ) entre los dos genotipos. Sin embargo el genotipo *GSTM1+* moduló el potencial genotóxico del IAA ( $p=0,001$ ) en las concentraciones media (0,045mM) y alta (0,183mM). El presente estudio demuestra el efecto citotóxico y genotóxico del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica y constituye un aporte científico esencial para esclarecer el mecanismo de acción del IAA y el papel de la susceptibilidad genética en la modulación del efecto de este compuesto.

**Palabras claves:** Subproductos de desinfección, ácidos haloacéticos, ácido iodoacético, índice de división nuclear, micronúcleos, genotoxicidad, *GSTM1*.

## INTRODUCCIÓN

En todas las sociedades humanas la disponibilidad del agua es una de las más grandes prioridades, no solo en cuanto a la cantidad necesaria para satisfacer las necesidades básicas de la población, sino también en garantizar una buena calidad del agua para evitar los problemas de salud pública asociados a su contaminación. Es por esta necesidad que la desinfección del agua juega un papel importante en controlar microorganismos que pueden llegar a ser patógenos y desarrollar enfermedades tales como la malaria, el cólera, fiebre tifoidea, etc. (Villanueva et al., 2001b). Sin embargo, los desinfectantes químicos usados pueden reaccionar con la materia orgánica natural o contaminantes antropogénicos, produciendo subproductos de la desinfección del agua (DBPs). Lo que ha planteado un problema de salud pública asociado al potencial para causar enfermedades crónicas como lo es el cáncer (Richardson et al., 2007).

Se han caracterizado entre 250 a 600 DBPs presentes en el agua potable, pero solo se ha identificado el perfil de comportamiento de sólo unos 20 DBPs, basándose en estudios de carcinogenicidad en roedores y en estudios epidemiológicos, los cuales sugieren una asociación entre el consumo de agua potable tratada con cloro y la aparición del cáncer de vejiga, colon y rectal (Boorman 1999, Richardson et al., 2007, Hebert et al., 2010). También se han evidenciado posibles efectos adversos en la salud reproductiva tales como abortos espontáneos, parto prematuro, bajo peso al nacer, muerte del feto, defectos cardiacos, enfermedades respiratorias, paladar hendido y defectos del tubo neural (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). Entre los DBPs caracterizados se incluye un importante grupo conocido como los ácidos haloacéticos (HAAs), estos han generado mucha atención debido a sus altas concentraciones en el agua potable, ya que son considerados los segundos subproductos de la cloración del agua, más abundantes después de los trihalometanos (THMs) presentándose en relación 2:1 con respecto a estos (Villanueva *et al.*, 2001a). Adicionalmente los

HAAs han demostrado tener una alta actividad carcinogénica y genotóxica (Villanueva *et al.*, 2001a, Plewa *et al.*, 2002, Zhang 2010,).

Para controlar la exposición humana a los DBPs, se han realizado estudios en los cuales se establecen niveles máximos de contaminantes (MCL) en el agua potable. En Colombia sólo se han regulado un grupo de DBPs, los THMs totales con un valor máximo de 0,2mg/L según lo estipulado en el artículo 5 de la resolución 2115 de 2007. La falta de estudios con respecto a los demás grupos de DBPs como HAAs, haloacetoneitrilos (HAN) y mutageno X (MX), ya regulados o en periodos de regulación en otros países, y su asociación con los posibles riesgos a desarrollar cáncer, hace pertinente la realización de estudios como este, que relaciona la concentración a la cual el ácido iodoacético (IAA), uno de los HAAs, altera el índice de división nuclear (IDN) y la frecuencia de micronúcleos (MN) en la inducción de la citotoxicidad y genotoxicidad. Lo cual podría representar un potencial adverso para la salud humana, y de esta manera contribuir al conocimiento necesario para la implementación de medidas de regulación para nuestro país.

Otra variable importante en nuestro estudio, es el efecto de la variabilidad genética dada por el polimorfismo en genes del metabolismo. Estudios muestran que el metabolismo de xenobióticos juega un papel determinante en la disminución del potencial tóxico, aumentando la solubilidad y modificando las estructuras químicas de compuestos altamente tóxicos (Castell, 2004). Actualmente se han identificado muchos polimorfismos en genes que codifican enzimas metabólicas, lo cual altera la capacidad de las personas de activar o detoxificar sustancias haciéndoles más susceptibles a desarrollar enfermedades por la acumulación de metabolitos tóxicos (Jimenez *et al.*, 2009). Uno de los genes del metabolismo más estudiado es el GSTM1 que pertenece a la familia glutatión S-transferasa (GST), que cataliza la detoxificación de compuestos electrofílicos, incluyendo carcinógenos, drogas

terapéuticas, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo. El polimorfismo del gen *GSTM1* consiste en la delección completa del gen aumentando la susceptibilidad al riesgo de generar cáncer (Rebbeck, 1997).

El sistema biológico usado en nuestra investigación fueron los linfocitos humanos de sangre periférica, constituyen un sistema extremadamente sensible que permite detectar las alteraciones en los cromosomas provocadas por su exposición a agentes tóxicos. Se puede disponer de ellos en grandes cantidades ya que hay de 1.200 a 4.500 en un mililitro de sangre y por lo general, los linfocitos que se obtienen de una muestra están sincronizados y se comportan igual con respecto a su ciclo de división celular (Rivera León E. et al., 2009).

La frecuencia de MN en linfocitos humanos de sangre periférica es ampliamente utilizado como un biomarcador, ya que predice el riesgo de generar cáncer (Bonassi et al., 2006). La frecuencia de MN en estudios *in vitro* permite evaluar tanto el daño clastogénico como aneugénico producido por la exposición a productos químicos y agentes genotóxicos, como lo es el IAA (Ascarrunz et al., 2006).

El objetivo de este estudio fue identificar el efecto citotóxico y genotóxico, *in vitro*, inducido por el IAA en linfocitos humanos de sangre periférica, mediante alteraciones en el IDN y en la frecuencia de MN respectivamente. Así mismo se determinó el efecto modulador del polimorfismo en el gen *GSTM1* mediante el análisis con linfocitos pertenecientes a individuos con el genotipo mutado (*GSTM1*-) y silvestre (*GSTM1*+).

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disponibilidad de agua potable es una de las prioridades en todas las sociedades humanas, además de la cantidad suficiente para cubrir las necesidades básicas, el agua debe tener una calidad que garantice su inocuidad para la salud. La desinfección es una etapa esencial en el proceso de potabilización del agua para eliminar microorganismos patógenos y evitar infecciones de origen hídrico (Villanueva et al., 2001b). Millones de personas en todo el mundo reciben agua potable químicamente tratada mediante sus servicios públicos. Sin embargo, la desinfección química mediante cloración ha planteado un problema de salud pública ya que la exposición de la población humana a los DBPs ha sido asociado al desarrollo de cáncer de diversos tipos y efectos adversos en neonatos de madres expuestas (Villanueva et al., 2001b, Richardson et al., 2007). Dentro de los DBPs, ya regulados, encontramos el grupo de los HAAs los cuales generan gran atención debido a sus altas concentraciones en el agua potable y por su potencial carcinogénico exhibido en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Sadiq et al., 2004, Zhang et al 2010).

Estudios epidemiológicos han planteado la posible asociación de los DBPs con el desarrollo de efectos adversos reproductivos y de desarrollo, tales como bajo peso al nacer, retraso del crecimiento intrauterino, y el aborto espontáneo (Richardson et al., 2007). Un estudio realizado en España demostró una gran relación entre los DBPs y el riesgo de generar cáncer de vejiga, con 111 muertes anuales por esta patología en varones, de las cuales se atribuían de 29 a 32 muertes debido a exposiciones directas con DBPs (Villanueva et al., 2001a). Otros estudios indican que el 9% de los casos de cáncer de vejiga y el 15% de casos de cáncer rectal, son 10000 casos adicionales de cáncer por año en los Estados Unidos, y podrían ser atribuidos a la cloración del agua y los subproductos (Yuefeng Xie., 2004). Se ha encontrado que la mayor parte del riesgo de cáncer de vejiga asociado con el agua clorada parece estar influenciado por la exposición directa en la ducha, el

baño y la natación, en lugar de beber el agua y el riesgo puede ser más alto para personas que tienen una mutación en genes de la GST, debido a que esta familia de genes interviene en el metabolismo de los DBPs (Kogevinas et al., 2010).

En Colombia, la regulación de los DBPs, se ha establecido siguiendo las directrices europeas de la organización mundial de la salud (OMS), las cuales establecen estándares legales en el agua para los THM, pero no ha determinado ningún estándar para los HAAs (OMS, 2004). Los Ministerios de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, han establecido un nivel máximo aceptable para los THM totales de 0,2mg/L (Art.5 resolución 2115 de 2007 de Colombia). De este modo sigue existiendo una gran brecha en cuanto a la falta de estudios que identifiquen los efectos citotóxicos y genotóxicos de los DBPs emergentes en células humanas, como lo es el IAA, que es considerado uno de los DBPs más tóxicos según estudios realizados, en células de ovario de hámster chino (CHO), *S. thipimurion* (Zhang, et al., 2010), líneas celulares humanas no transformadas FHs, linfoblastomas TK6 y en líneas celulares derivadas del tejido hepático humano (Liviac et al., 2010, Pals et al., 2011, Zhang et al., 2012). Nuestro estudio pretende reducir la brecha de conocimiento en cuanto a los mecanismos de citotoxicidad y genotoxicidad inducidas por el IAA en células humanas, como los linfocitos de sangre periférica.

En el Cauca se han llevado a cabo pocos estudios referentes a los sub productos de la desinfección del agua, uno de ellos fue realizado por el Grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca (Escobar-Hoyos et al., 2013). Otro estudio fue el realizado por la planta de tratamiento de Popayán en mayo del 2011 con ayuda del laboratorio Ivonne Bernier LTDA, en el cual se determina la concentración, en el agua potable, de los THM, mediante un análisis fisicoquímico, en dos plantas de tratamiento (Tablazo y Tulcán) (Laboratorio IB., 2011). Los resultados mostraron que las concentraciones

de THM eran menores al valor máximo permitido (0,2mg/L) para Colombia en la calidad de agua para consumo humano, pero probablemente sobrepasa los valores establecidos por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) para los THM con un valor máximo de 0,08mg/L (Richardson *et al.*, 2002).

Pocos estudios se han realizado para evaluar el efecto genotóxico, lo cual es importante como prueba de tamizaje para determinar su potencial riesgo en la salud de personas expuestas. Por lo tanto el presente estudio pretende resolver las siguientes preguntas: ¿es el ácido iodoacético capaz de inducir daño a nivel genético en linfocitos humanos de sangre periférica y puede ser este daño modulado por el polimorfismo en el gen GSTM1? si es así ¿son los MN un biomarcador sensible para evaluar el potencial genotóxico producido por el ácido iodoacético?



## 2. JUSTIFICACIÓN

La exposición a DBPs es una problemática de salud pública mundial, ya que la formación de DBPs por la cloración del agua potable representa un riesgo sobre la salud de las personas según lo corroboran diversos estudios tanto en animales como epidemiológicos, que muestran las propiedades mutagénicas y carcinogénicas de los subproductos de desinfección del agua (Doyle et al., 1997, Villanueva et al., 2001a, Zhang et al., 2010).

En los estudios que se han realizado con los HAAs se demuestra que estos son mutagénicos en *Salmonella typhimurium*, citotóxicos y mutagénicos en células de ovario de hámster chino (CHO-K1), citotóxicos y genotóxicos tanto en células CHO AS52 como en células humanas no transformadas FHs, en células humanas TK6 son citotóxicos, teratogénicos pero no clastogénicos. Dentro de los HAAs con una sustitución halógena simple (monoHAAs) se encuentran incluidos el IAA, el ácido bromoacético (BAA) y el ácido cloroacético (CAA). El IAA presenta el nivel de toxicidad más alto entre los monoHAAs siguiendo este orden: IAA > BAA > CAA (Pals *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta la falta de estudios sobre el IAA y su interacción en un sistema biológico como los linfocitos humanos de sangre periférica, el propósito de esta investigación a mediano plazo fue evidenciar los efectos citotóxicos y genotóxicos producidos en células humanas, lo cual puede generar a largo plazo y con la realización de mas estudios, la implementación de medidas de regulación para nuestra región y país.

El grado de susceptibilidad y la respuesta del organismo a xenobióticos, está influenciada en gran parte por factores genéticos como los polimorfismos en GST, genes encargados de la detoxificación en el metabolismo humano. Es de suponer

que la genotipificación de los polimorfismos solos o en combinación, contribuyen a la identificación de individuos que son deficientes en la detoxificación y por lo tanto más propensos a sufrir algún tipo de alteración a nivel genético y/o mutaciones (Strange *et al.*, 2000). Para determinar si el gen GSTM1 modula la citotoxicidad y la genotoxicidad del IAA, nuestro trabajo caracteriza la variabilidad que se pueda presentar en el IDN y la frecuencia de MN respectivamente entre los genotipos GSTM1+ y GSTM1-.

Uno de los sistemas biológicos más utilizados, por su fácil obtención mediante métodos poco invasivos para los individuos donadores, son los linfocitos humanos de sangre periférica, estos ofrecen grandes ventajas en estudios *in vitro* porque su cultivo permite la obtención de grandes cantidades de células, y además, este sistema biológico resulta ser muy sensible en la detección de daño cromosómico, permitiendo detectar tóxicos ambientales con capacidad citotóxica y genotóxica, por lo cual se ha validado internacionalmente como un sistema biológico efectivo para el análisis de biomarcadores genotóxicos que predicen riesgo de cáncer (Hagmar *et al.*, 1994). Por esta razón se escogió este sistema biológico para el desarrollo de este trabajo.

Los biomarcadores citogenéticos han sido ampliamente utilizados en biomonitoreos de poblaciones expuestas a genotóxicos y para evaluar efectos primarios de carcinógenos (Norppa, 2004). Uno de los más usados es la prueba de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos, que fue validada a nivel mundial y considerado como un biomarcador efectivo de daño en el ADN y de riesgo a cáncer (Bonassi *et al.*, 2006). Con este ensayo es posible medir tanto la pérdida de cromosomas enteros, como también las rupturas cromosómicas, permitiendo evaluar tanto el daño clastogénico como aneugénico producido por la exposición a productos químicos y agentes genotóxicos. La metodología de MN es simple y permite una evaluación rápida de las células, por lo que es un procedimiento

económico para implementarlo a gran escala. Los ensayos de MN sólo pueden ser eficaces como dosimetría biológica cuantitativa si se pueden identificar a las células que se han dividido después de la exposición, pues sólo células postmitóticas expresan micronúcleos (Zalacain *et al.*, 2005).

Por todo lo sustentado anteriormente la realización de este proyecto se hace pertinente y necesaria, para poder evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica. Con los resultados que se obtengan se producirá conocimiento en cuanto a las propiedades genotóxicas y carcinógenas de estas sustancias químicas y los mecanismos celulares que influyen su toxicidad. Este estudio es viable debido a que se cuenta con la infraestructura apropiada la cual nos brinda el espacio y los materiales para poder desarrollar el estudio con toda rigurosidad científica, y también se cuenta con las técnicas previamente estandarizadas, las cuales garantizan llevar a cabo el desarrollo de esta prueba y cumplir con todos los objetivos planteados.

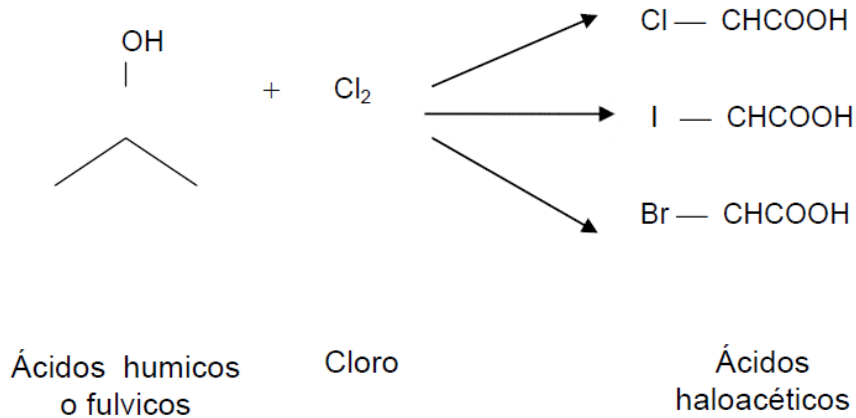
### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 SUBPRODUCTOS DE LA DESINFECCIÓN DEL AGUA

El cloro, uno de los químicos más empleados en el proceso de desinfección del agua, se caracteriza por ser altamente reactivo con la materia orgánica natural del agua, lo que conlleva a producir cierto tipo de químicos indeseados conocidos como DBPs, se han realizado diversos estudios epidemiológicos en los cuales se asocian estos compuestos con diferentes patologías principalmente con el cáncer de diversos tipos y con algunos efectos adversos en neonatos de madres expuestas, concluyendo así que estos subproductos presentan propiedades tanto mutagénicas como carcinogénicas (Villanueva *et al.*, 2001b).

Dentro de los DBPs podemos encontrar los THM, HAAs, HAN y MX, de estos productos químicos, los THM y los HAAs son los más habituales en el agua potable clorada. Otros subproductos, como los HAN y el MX, se forman en cantidades menores durante el proceso de cloración del agua. Cabe señalar que algunos DBPs se encuentran en periodos de regulación. En general, los DBPs bromados son más genotóxicos y cancerígenos que los compuestos clorados y los DBPs yodados son los más genotóxicos de todos, pero estos no han sido estudiados en pruebas de carcinogenicidad (Richardson *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que cada planta de tratamiento de agua tiene su propio espectro y distribución de DBPs, dependiendo de factores como la calidad del agua, pH, precursores de la materia orgánica (ácidos húmicos, fúlvicos, aminoácidos), entre otros (Liviac *et al.*, 2010), y que utilizan otros tipos de desinfectantes para tratar el agua potable, como el ozono, el dióxido de cloro y la cloramina, normalmente en combinación con el cloro, siempre se van a producir los DBPs, variando las concentraciones con que aparecen, ya que cada desinfectante produce su propio grupo de subproductos durante el proceso de tratamiento (Rodríguez *et al.*, 2007). La reacción que se puede asumir para la producción de los HAAs es la siguiente:

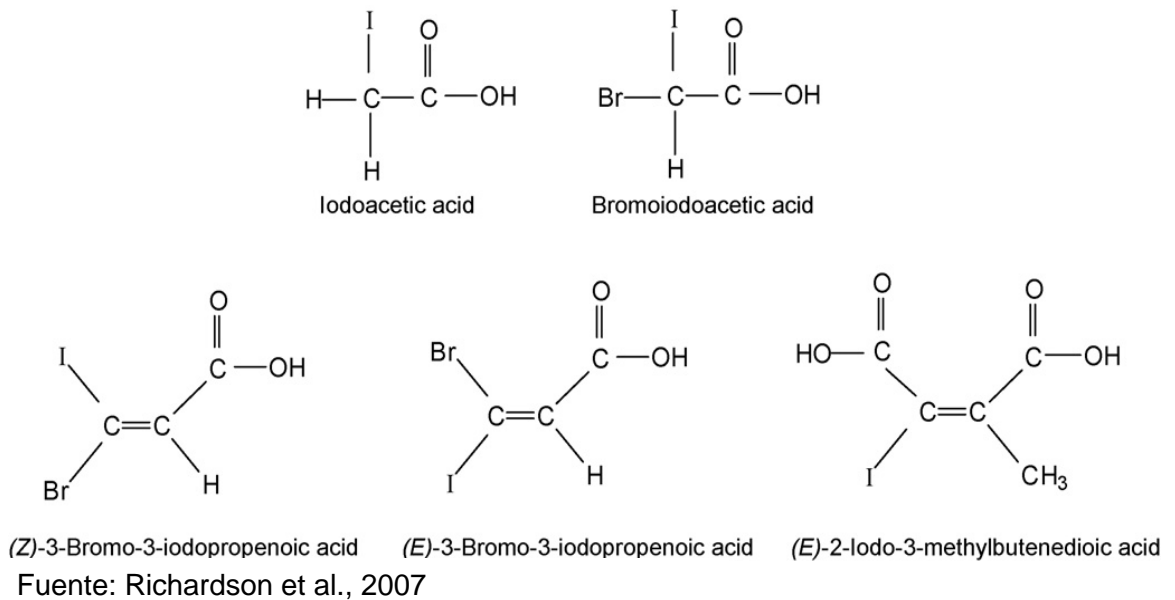
**Figura 1:** Producción de ácidos haloacéticos



Fuente: Richardson et al., 2007

Los ácidos iodados, pertenecientes a los HAAs, son una nueva, y potencialmente toxicológica clase de DBPs, de los cuales se ha identificado una parte, estudios en los EE.UU identificaron cinco de ellos en el agua potable (Figura 2): IAA, BAA, ácido (Z)-3-bromo-3-iodopropenoico, ácido (E)-3-bromo-3-iodopropenoico, y ácido (E)-2-iodo-3-methylbutenedioico (Richardson et al., 2007).

**Figura 2.** Ácidos haloacéticos



El IAA es el causante de un daño a nivel genético en los linfocitos humanos, debido a la capacidad estimada de los HAAs para atravesar las membranas celulares con mayor facilidad que otros DBPs, generando especies reactivas de oxígeno, lo que conlleva a un estrés oxidativo en la célula, el cual está directamente involucrado en la inducción de una mayor genotoxicidad y mutagenicidad (Cemeli et al., 2006). La formación de micronúcleos inducida por el IAA y por tanto el daño genotóxico que se genera, también se puede deber a que esta familia de ácidos (HAAs) son buenos inductores de rupturas en las cadenas del ADN en células de mamíferos, como también se caracterizan por formar sitios apurínicos (Plewa, 2004); aparte de estos daños, pueden inducir mutaciones en los sitios AT y generar en su gran mayoría sustituciones de bases que son transiciones de GC a AT (Richardson et al., 2007). Estudios recientes indican que el IAA interviene en el ciclo de la glucólisis inhibiendo la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ocasionando un incremento de la citotoxicidad y genotoxicidad (Pals *et al.*, 2011).

### **3.2 METABOLISMO Y BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS**

Un proceso biológico adquirido en el transcurso de la evolución por el ser humano, es el de metabolizar compuestos en el organismo, facilitando así su activación y también su eliminación. Estos compuestos también llamados xenobióticos (XB), se pueden encontrar en los alimentos, drogas y el medio ambiente, donde si la concentración de cualquier xenobiótico resulta ser tóxica para el organismo, inevitablemente conllevará a un riesgo para las funciones de las biomoléculas que actúan en su entorno, pudiendo alterar el correcto funcionamiento de un órgano, tejido, sistema, etc., e interferir en las reacciones bioquímicas (Castell, 2004). El proceso de biotransformación se subdivide en: la Fase I la cual engloba procesos químicos de distinta naturaleza (oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis), cuyo resultado es la modificación química de las moléculas con la aparición de nuevos grupos funcionales. Reacciones de conjugación se dan en la Fase II

(glucuronidación, sulfonación y conjugación con GSH), donde los XBs polares, son conjugados con sustancias endógenas hidrofílicas. Estas reacciones enzimáticas están encaminadas a aumentar aún más la hidrosolubilidad de sus sustratos y por lo tanto hacerlos más fácilmente excretables por el organismo (Del Arco, 1997).

### **3.3 GLUTATION S-TRANSFERASA**

Glutación S-transferasa (GST), constituye una superfamilia de enzimas ubicuas y multifuncionales, que desempeñan un papel fundamental en la detoxificación celular, metabolizando xenobióticos en la fase II y protegiendo macromoléculas de los ataques por reactivos electrofílicos (Buchard *et al.*, 2007). La GST cataliza la conjugación del tripéptido glutación (GSH) a una amplia variedad de productos químicos exógenos y endógenos con grupos funcionales electrofílicos (por ejemplo, productos de estrés oxidativo, los contaminantes ambientales y sustancias cancerígenas), neutralizando sus sitios electrofílicos, y transformándolos en productos más solubles en agua. Sobre la base de homología de secuencias y de reactividad cruzada inmunológica, GST citosólicas en humanos han sido agrupadas en siete familias, designadas como GST Alpha, Mu, Pi, Sigma, Omega, Theta y Zeta (Parl, 2005).

En vista de la importancia de la GST en la desintoxicación celular de sustancias cancerígenas, las variantes genéticas de GST han llamado la atención de los epidemiólogos en relación con el riesgo de cáncer. Es así como nos centramos en estudiar un polimorfismo presente en la subfamilia Mu correspondiente al gen GSTM1. Las frecuencias de las deleciones varían entre poblaciones, alrededor del 50% de los caucásicos son homocigotos para el alelo GSTM1 nulo, GSTM1\*0 (Strange *et al.*, 2000). En los últimos años, se han investigado los efectos de las variantes genéticas del gen GSTM1 en relación con diversos factores, especialmente la susceptibilidad al cáncer y la efectividad en su tratamiento

(Buchard *et al.*, 2007). Estudios basados en los polimorfismos de la familia GST, están principalmente relacionados con el cáncer de vejiga tras la exposición a los DBPs (Cantor *et al.*, 2006).

### **3.4 ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR (IDN)**

La determinación de IDN y la proporción de células que sufren necrosis y apoptosis, proporcionan información importante sobre las propiedades citostáticas y citotóxicas del agente que está siendo evaluado. En los linfocitos humanos, el IDN también proporciona una medida de la respuesta mitógena, que es un biomarcador útil relacionado con la exposición genotóxica. El IDN proporciona una medida de proliferación de células viables. Por lo tanto, es un indicador de efectos citostáticos (Fenech, 2007).

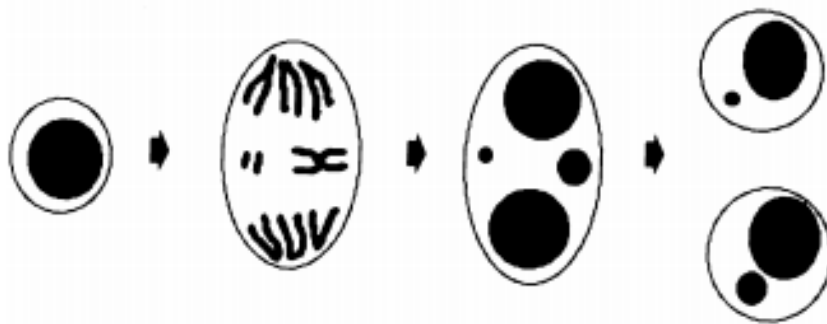
### **3.5 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

Los micronúcleos se forman a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos rezagados, que no están incluidos en los núcleos principales de las células hijas durante la división nuclear (Figura 3 y 4). Por lo tanto, los MN proporcionan una medida de rupturas cromosómicas y la pérdida de los cromosomas (Fenech *et al.*, 1999). El uso del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, quienes consiguieron bloquear el proceso de división celular con citocalasina B, para observar células con MN formadas durante el primer ciclo de división celular (Fenech, 1993).



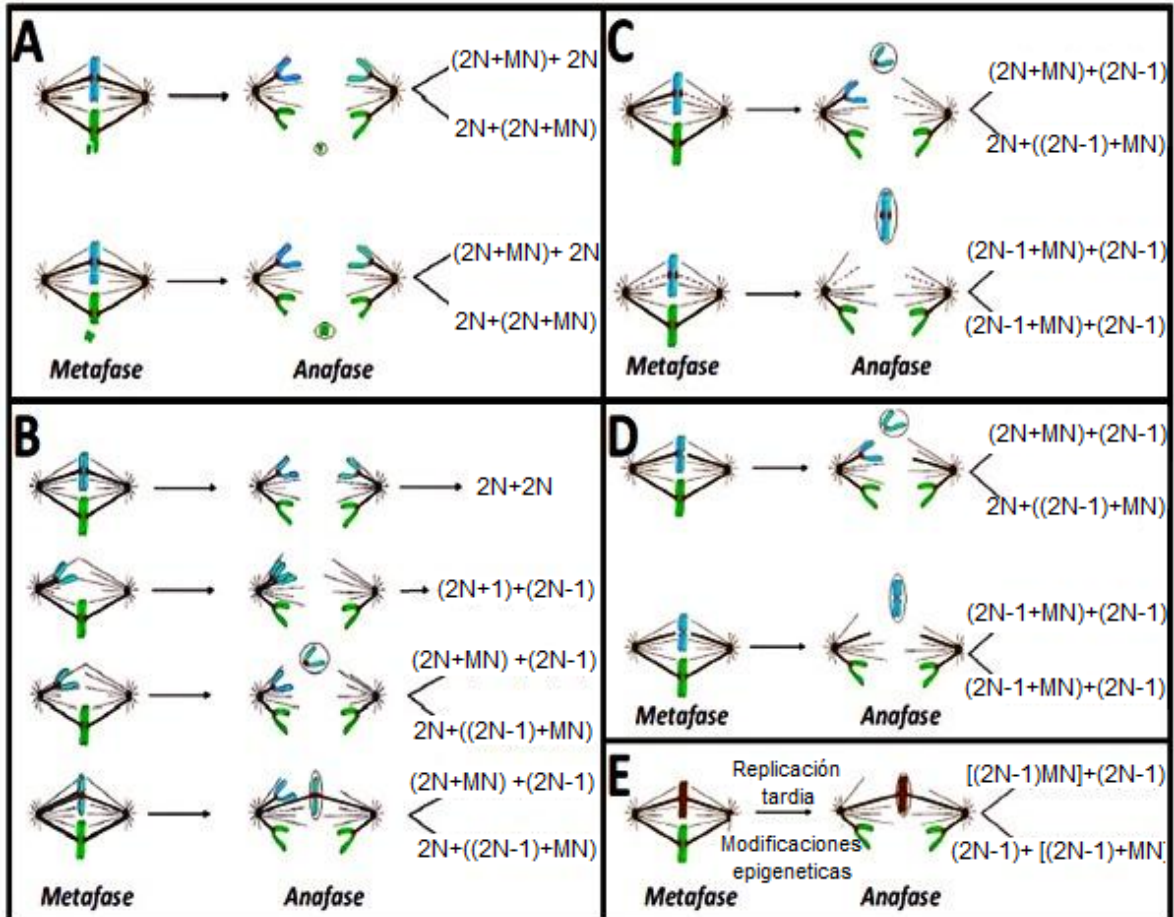
La prueba de MN en linfocitos humanos de sangre periférica permite medir tanto la pérdida del cromosoma entero como también las rupturas cromosómicas, los cuales permiten evaluar el daño clastogénico como aneugénico producido por la exposición a productos químicos y agentes genotóxicos. La metodología de MN es simple y permite una evaluación rápida de las células, por lo que es un procedimiento económico para implementarlo a gran escala. El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN, ya que la sensibilidad de la técnica fue validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN debido en gran parte a que se reconocieron los factores que influían en la frecuencia de MN tales como edad, género, consumo de drogas, agentes químicos genotóxicos, etc. y debido a que esta prueba permitía ser reproducible en diferentes laboratorios sin una variabilidad significativa. Para la validación se creó el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: HUMAN MicroNucleus Project), liderado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo (Zalacain et al., 2005).

**Figura 3.** Formación de MN



Fuente: Fenech et al., 1999

**Figura 4.** Posibles mecanismos de formación de los MN



**A.** Rompimiento de ADN que originan fragmentos cromosomales acéntricos. **B.** Alteraciones en la fijación de las fibras de tubulina del huso acromático con los cinetocoros de los centrómeros cromosomales. **C.** Despolimerización de la tubulina. **D.** Defectos centroméricos asociados a alteraciones en los cinetocoros. **E.** Replicación tardía del DNA y modificaciones epigenéticas de las histonas (hiperacetilación, metilación y fosforilación).

Fuente: (Mateuca et al., 2006)

#### 4. ANTECEDENTES

La exposición a los subproductos de la desinfección (DBPs) en el agua potable se ha asociado con el riesgo de cáncer de vejiga y colorrectal (Kogevinas *et al.*, 2010). En algunos estudios realizados, se observó su capacidad genotóxica de ciertos HAAs, entre los cuales se encontraban el IAA, BAA, ácido dibromoacético (DBAA), ácido tribromoacético (TBAA), y el CAA. En general, los cinco fueron mutagénicos en *Salmonella* e indujeron daño en el ADN (ensayo SCGE) de células CHO, en ausencia de S9. Además, el IAA indujo alteraciones cromosómicas en células de mamíferos *in vitro* (Plewa *et al.*, 2004, Richardson *et al.*, 2007).

En un ensayo se determinó la toxicidad del IAA con y sin anti oxidantes (catalasa y el hidroxianisol butilado (BHA)) en *Salmonella typhimurium* cepa TA100, y con ovario de hámster chino (CHO). Ni la catalasa, ni el BHA disminuyeron el nivel de citotoxicidad inducida por el IAA en *S. typhimurium*, ni en las células CHO. Sin embargo, en *S. typhimurium*, el BHA y la catalasa disminuyeron la mutagenicidad del IAA en un 33,5 y 26,8%, respectivamente. Asimismo, el BHA y la catalasa disminuyeron el daño genómico del ADN inducido por el IAA en un 86,5 y 42%, respectivamente. Concluyendo que el estrés oxidativo está involucrado en la inducción de genotoxicidad y mutagenicidad por el IAA (Cemeli *et al.*, 2006).

Un ensayo de genotoxicidad realizado con tres ácidos monoHAAs (IAA, BAA, CAA) en células TK6, usando como biomarcador el ensayo de MN con bloqueo de citocinesis para evaluar la inducción del daño cromosómico, la citotoxicidad y los efectos clastogénicos y aneugénicos, encontró que ninguno de los tres HAAs incrementa significativamente la frecuencia de MN en células binucleadas TK6, pero si se observó una diferencia significativa en la citotoxicidad inducida por el

IAA, clasificado como el más citotóxico de los tres ácidos monoHAAs evaluados (Liviak *et al.*, 2010).

En estudios recientes se examinaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de seis HAAs comunes, mediante un ensayo de citotoxicidad y una mutación en el gen HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa) en células CHO-K1. Los resultados obtenidos permitieron clasificar según su nivel de toxicidad a los seis HAAs, en el siguiente orden descendente: IAA> BAA> DBAA> CAA> ácido dicloroacético (DCAA)> Ácido tricloroacético (TCAA), y según su potencial mutagénico fueron clasificados de la siguiente manera: IAA> DBAA> BAA> CAA> DCAA> TCAA. Además, permitieron determinar que la toxicidad del IAA es 1040 veces mayor que la del TCAA, que todos los HAAs, excepto TCAA mostraron ser mutagénicos en células CHO-K1 y que hubo una correlación estadísticamente significativa entre la citotoxicidad y mutagenicidad de los HAAs en células CHO-K1 (Zhang *et al.*, 2010).

En un ensayo donde se comparó el daño del DNA producido por 15 DBPs, entre los cuales se encontraban 4 THMs, 6 HAAs, 3 HANs, 1 MX y 1 Clorohidrato cloral (CH), en una línea celular derivada del tejido hepático humano (HepG2) usando el ensayo cometa, se evidenció que el IAA es el más genotóxico de los 15 DBPs evaluados seguido por el BAA (Zhang *et al.*, 2012). Este ensayo también permitió establecer la sensibilidad que presenta el ensayo cometa para determinar el daño genotóxico en esta línea celular y lograr determinar que los DBPs iodados son más genotóxicos que los bromados y mucho más que los clorados (Zhang *et al.*, 2012).

Un estudio realizado en linfocitos humanos primarios polimórficos para los genes de la reparación del ADN XRCC1<sup>399</sup> y XRCC3<sup>241</sup>, donde se evaluó el efecto genotóxico y clastogénico de tres monoHAAs, CAA, BAA y IAA, mostró una

actividad citotóxica y genotóxica en el siguiente orden: IAA > BAA >> CAA. Con respecto a la cinética de reparación del daño en el ADN, causada por los tres monoHAAs, los resultados mostraron que el 50% del daño en el ADN es reparado en las primeras 6 h de recuperación líquida, no incrementada después de las 24 h de recuperación. Adicionalmente hubo un incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas indicando el efecto clastogénico producidos por estos compuestos a diferentes concentraciones (Escobar-Hoyos *et al.*, 2013).

Estudios epidemiológicos realizados con nadadores en piscinas cubiertas, dió como resultado un mayor riesgo de desarrollar cáncer de vejiga entre los sujetos que asisten a las piscinas en relación con los que no asisten, observando así, que después de la natación la concentración total de THM en el aire espirado fue siete veces mayor que antes de nadar. También se ha observado que la frecuencia de micronúcleos en linfocitos y en células exfoliadas de vejiga después de nadar es proporcional al aumento en las concentraciones exhaladas de los trihalometanos bromados. La natación no se asoció con daño en el ADN detectable por el ensayo cometa. La mutagenicidad en células exfoliadas de vejiga aumentó significativamente después de nadar, en asociación con la mayor concentración de bromoformo exhalado (Villanueva *et al.*, 2007, Kogevinas *et al.*, 2010).

Un estudio caso control realizado en España, donde se ha incrementado el riesgo de cáncer de vejiga tras la exposición a DBPs, investigó los efectos conjuntos sobre el riesgo de cáncer de vejiga y la exposición a los DBPs relacionándolos con los polimorfismos de la familia GST, que están asociados al cáncer de vejiga, sugiriendo que los polimorfismos presentes en esta familia incrementan el riesgo de padecer cáncer de vejiga (Cantor *et al.*, 2006).

## **5. OBJETIVO**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos citotóxico y genotóxico, inducidos por el ácido iodoacético *in vitro* en linfocitos humanos de sangre periférica y la modulación del polimorfismo del gen del metabolismo *GSTM1*.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer el efecto citotóxico inducido por el ácido iodoacético en linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* mediante el Índice de División Nuclear (IDN).
2. Determinar el efecto genotóxico inducido por el ácido iodoacético en linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* utilizando la prueba de micronúcleos.
3. Identificar el efecto modulador del polimorfismo en el gen *GSTM1* en la inducción del daño citotóxico y genotóxico por el ácido iodoacético, en linfocitos humanos de sangre periférica.

## 6. HIPOTESIS

Si las diferentes concentraciones del ácido iodoacético, causa efectos citotóxicos y genotóxicos en linfocitos humanos de sangre periférica, se espera observar una variación del rango normal del índice de división nuclear (IDN) y de la frecuencia de micronúcleos respectivamente, con relación al control (H1); de lo contrario el IDN y la frecuencia de micronúcleos en los cultivos tratados con las diferentes concentraciones del ácido iodoacético, con respecto a los cultivos control, no presentarán diferencia significativa (H0).

Si el gen GSTM1 tiene efecto modulador de la citotoxicidad y genotoxicidad del ácido iodoacético, se espera que haya una alteración del IDN y un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos en el genotipo mutado (H1); de lo contrario la frecuencia será igual en los genotipos mutados y silvestres (H0).

## **7. METODOLOGÍA**

Este estudio es de tipo experimental comparativo *in vitro*, utilizando como sistema biológico los linfocitos humanos de sangre periférica.

### **7.1 DONANTES DE SANGRE**

Se obtuvo las muestras de sangre de dos individuos saludables, de entre 20 y 25 años de edad, genotipificados previamente. Para el gen GSTM1 el individuo 1 presenta delección y el individuo 2 presenta el gen normal. Los individuos participantes diligenciaron una encuesta para conocer información demográfica, antecedentes del estilo de vida y de salud. Luego de firmado el consentimiento informado, se tomaron cinco muestras de sangre de 10 cm<sup>3</sup> por individuo, mediante punción venosa.

### **7.2 GENOTIPIFICACIÓN**

El ADN se aisló de linfocitos humanos de sangre periférica utilizando el kit DNeasy (Qiagen), posterior a esto se realizó una PCRmultiplex para la amplificación del gen GSTM1 y del gen CYP1A1 utilizado como control interno de la reacción. El producto de amplificación se observó en un gel de agarosa por electroforesis y la delección del gen GSTM1 se detectó por la ausencia de la banda a 215 pares de bases (pb).

### **7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Cada muestra de sangre, obtenida de los participantes, fue sometida a tres tratamientos del IAA y a dos controles, cada una con una réplica (tabla 1), para obtener un total de dos datos por tratamiento de cada genotipo. Esto se considera



como un experimento total al cual se le realizan 5 repeticiones y así obtener el número de datos adecuado para el análisis estadístico. Las concentraciones de los tratamientos se establecieron partiendo de un trabajo previo que se realizó en el Grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, en el cual se escogieron dos concentraciones (baja y media) a las cuales el índice mitótico de los linfocitos se disminuyó en menos de un 50% y una concentración adicional (alta) a la cual el índice mitótico se redujo en más del 50% (Escobar-Hoyos et al., 2013).

**Tabla 1.** Diseño experimental.

Grupos	Subgrupos tratamientos	Concentraciones (mM)	No. de células para registro de MN	No. de células para registro de IDN
Control negativo	RPMI completo sin SBF	0		
	Baja	0,0025		
Ácido Iodoacético	Media	0,045	2000	1000
	Alta	0,183		
Control positivo	Etil Metano Sulfonato (EMS)	2,26		

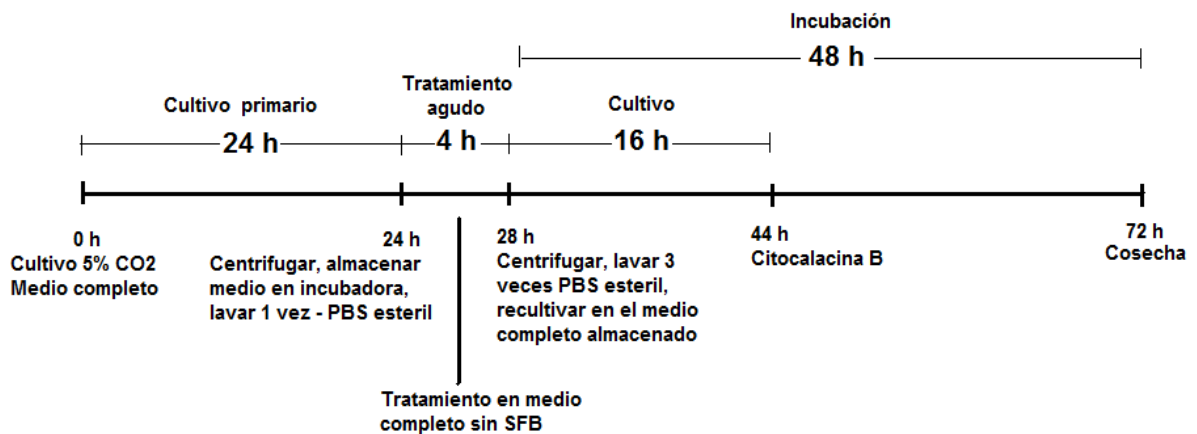
#### 7.4 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Para determinar la genotoxicidad se utilizó como biomarcador la frecuencia de micronúcleos (MN) la cual se obtiene registrando el número de células, que hayan pasado por más de un ciclo de división celular (binucleadas) con micronúcleos, en un total de 2000 células binucleadas (Bonassi et al., 2006).

### 7.4.1 Cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica

En condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar, se realizó la siembra de linfocitos humanos de sangre periférica en tubos falcón estériles con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de antibiótico (estreptomicina - penicilina) y 1% de L-glutamina. Se adicionaron 4.5 ml del medio de cultivo RPMI 1640 completo en tubos falcón de 15ml, se adicionó 8 gotas de sangre al medio completo, y los linfocitos fueron estimulados con 0.1 ml de Fitohemaglutinina. Se incubaron los cultivos a 37°C por 24 horas y transcurrido este tiempo se inició el tratamiento agudo (4 horas) en el cual se aplicó cada una de las concentraciones del IAA. Luego de 44 horas de iniciada la incubación se adicionaron 0.1 ml de Citocalasina B a una concentración final de 3µg/ml y a las 72 horas se realizó la respectiva cosecha (figura 5).

**Figura 5.** Línea de tiempo del protocolo de micronúcleos con DBPs



### 7.4.2 Tratamiento agudo con IAA

Transcurrida las 24 horas de incubación, se centrifugó los tubos a 1000 rpm por 10 minutos, se retiró el medio sobrenadante y se depositó en un tubo nuevo estéril para ser almacenado a 37°C. Se adicionó 5ml de PBS estéril a cada tubo y se

resuspendió hasta desprender cada botón, se centrifugó los tubos a 1000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 4.2ml de medio completo sin SBF y 0,8ml de cada tratamiento. Los cultivos fueron tratados con 3 concentraciones del IAA: baja 0,0025, media 0,045 mM y alta 0,183 mM, las cuales fueron estandarizadas y establecidas en el ensayo de alteraciones cromosómicas realizado por el Grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética (Escobar-Hoyos et al 2013.). Los cultivos se incubaron a 37°C por 4 horas. Luego de transcurrido el tiempo del tratamiento agudo se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se desprendió el botón. Se adicionó 5ml de PBS estéril y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos. Se realizaron dos lavados mas con PBS y en el último lavado se dejó sólo el botón celular, para agregarle el medio almacenado anteriormente. Se dejó incubar por 16 horas más y se adiciono la Citocalasina B. luego de 72 horas de iniciada la incubación de los cultivos, se realizó la cosecha.

#### **7.4.3 Cosecha de linfocitos tratados con IAA**

Luego de 72 horas de la siembra de los linfocitos humanos de sangre periférica se realizó la cosecha. Los cultivos son llevados a centrifugación a una velocidad de 1000 rpm durante 8 minutos, posterior a esto se descarta el sobrenadante y se adiciona solución hipotónica (0,075M KCl) por 3 min, se pre-fijó adicionando metanol y ácido acético con una relación 3 a 1 (carnoy), se llevan a centrifugación nuevamente a 1000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 5 mL de carnoy este último paso se realizó tres veces más. Se procedió a gotear en placas frías para obtener un buen extendido celular. Se dejaron secar las placas goteadas a temperatura ambiente y posteriormente fueron teñidas en una solución de Giemsa al 10% durante 7 min. La evaluación microscópica se realizó en 2000 células binucleadas para cada concentración en placas codificadas, y se contó el número total de MN y la frecuencia de células con MN.

#### **7.4.4 Índice de división nuclear (IDN)**

El IDN se utilizó para determinar la citotoxicidad del IAA y se calculó de acuerdo al método de Eastmond y Tucker (1989). Se determinó un número de 1000 células viables para reportar la frecuencia de células mononucleadas ( $M_1$ ) que representan a las células que no se han dividido en el cultivo y las células binucleadas ( $M_2$ ), células trinucleadas ( $M_3$ ), tetra o polinucleadas ( $M_4$ ) que son aquellas que se han dividido más de una vez en el tiempo de cultivo, permitiendo establecer un índice de proliferación. La fórmula es:

$$\text{IDN} = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / N$$

Donde, N es el número total de células viables (con exclusión de células en necrosis y apoptosis).

#### **7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa SPSS 11.5 para el análisis del ajuste a la distribución normal y homogeneidad de varianzas de los datos registrados para el IDN y la frecuencia de MN con relación a las concentraciones del IAA. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) la cual mostro que los datos se ajustan a la distribución normal, y por lo tanto se aplicaron pruebas paramétricas. Se realizó un análisis comparativo con la prueba de ANOVA, complementada con la prueba T3 de Dunnet, las cuales nos permitieron hacer comparaciones entre tratamientos y grupos control con un intervalo de confianza del 95% o probabilidad de error del 5%. Para determinar la correlación existente entre las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad con las concentraciones del IAA, se utilizó la prueba de asociación de Pearson. Para determinar el efecto modulador del gen GSTM1 se utilizó la prueba de los efectos intersujetos acompañada de la prueba T3 de Dunnet, para identificar la diferencia significativa entre cada concentración.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

En la tabla 2 se muestran los promedios y la desviación estándar del IDN registrados en las cinco repeticiones experimentales, presentan un rango de  $1,33 \pm 0,003$  a  $1,11 \pm 0,01$ , para el control negativo y las concentraciones del IAA. Los datos de IDN se ajustaron a la distribución normal (Shapiro Wilk  $p > 0,05$ ), por tanto se realizó un análisis comparativo con la prueba de ANOVA, complementada con la prueba T3 de Dunnet, las cuales permitieron establecer que si existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los promedios del IDN, y que estos disminuyen a medida que aumentan las concentraciones del IAA, mostrando 1,19 veces más citotoxicidad en la concentración alta con respecto al control negativo.

**Tabla 2.** Índice de División Nuclear en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con IAA (media  $\pm$  D.S).

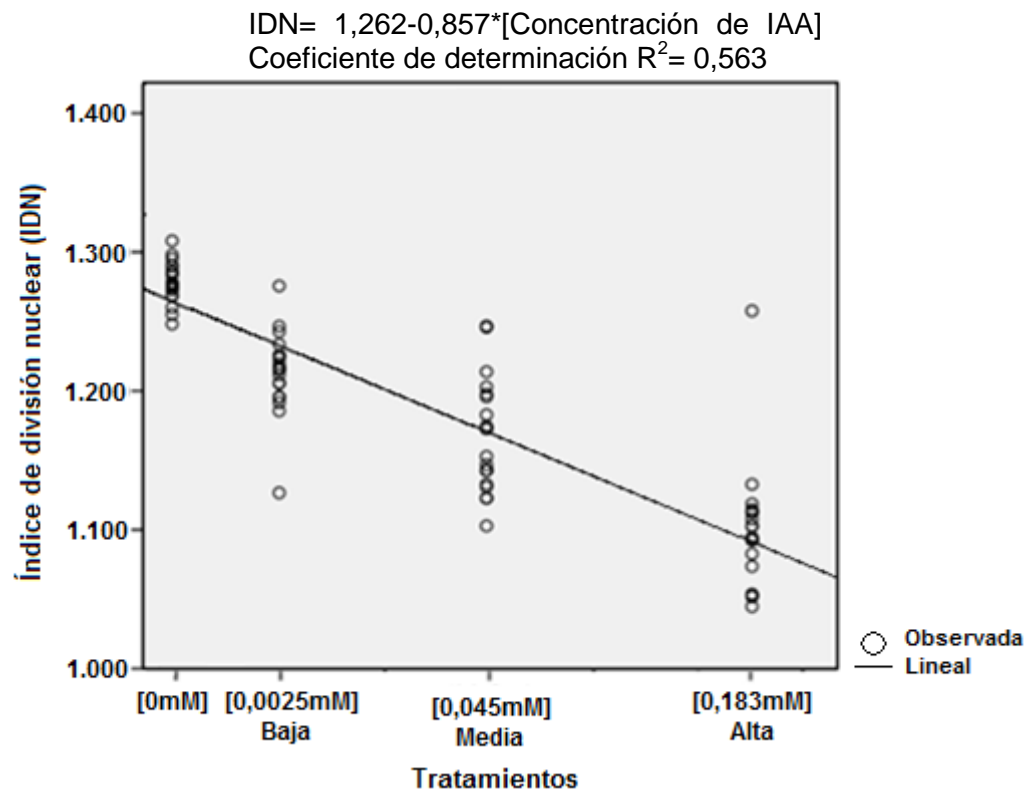
Grupos	Subgrupos tratamiento	Concentración (mM)	IDN
Control negativo	RPMI completo sin SFB	0	$1,33 \pm 0,003$
	Baja	0,0025	$1,228 \pm 0,006^*$
Ácido iodoacético	Media	0,045	$1,174 \pm 0,009^*$
	Alta	0,183	$1,117 \pm 0,01^*$
Control positivo	Etil metano Sulfonato (EMS)	2,26	$1,086 \pm 0,008^*$
Total			$1,187 \pm 0,009$
Valor -p			0,001

Índice de división nuclear (IDN) =  $[M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)]/N$ , donde M1-M4 representan el número de células con 1 a 4 núcleos, contadas en 1000 células viables; N=número total de viables

\*  $p < 0,05$  respecto al control negativo (prueba de ANOVA)

Mediante la prueba de asociación de Pearson se identificó una asociación lineal negativa, estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ), mostrando un efecto concentración-respuesta, en el cual un aumento en la concentración del IAA disminuye el IDN, como se muestra en la figura 6. La relación de tipo lineal se describe con la ecuación:  $IDN = 1,26 - 0,857 * [\text{Concentración IAA}]$ . El coeficiente de determinación  $R^2 = 0,563$  indica que la variabilidad en el promedio del IDN depende en un 56,3% de la variabilidad en las concentraciones del IAA.

**Figura 6.** Curva de mejor ajuste que explica la asociación lineal negativa, de la citotoxicidad, con un 95% de confianza.



## 8.2 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD

Los datos del promedio de la frecuencia de MN se ajustaron a la distribución normal mediante la prueba de Shapiro Wilk ( $p > 0,05$ ), por tanto se realizó un análisis comparativo con la prueba de ANOVA, complementada con la prueba T3

de Dunnet. Estos promedios y su desviación estándar presentan un rango de  $0,0002 \pm 0,0001$  para el control negativo a  $0,017 \pm 0,001$  para la concentración alta del IAA, y se muestran en la tabla 3. Mediante las cuales se estableció que si existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) y que la concentración alta del IAA mostró una actividad genotóxica 85 veces mayor con respecto al control negativo.

**Tabla 3.** Frecuencia de MN en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con IAA (media  $\pm$  D.S).

Grupos	Subgrupos tratamiento	Concentración (mM)	No. De células binucleadas con MN	Frecuencia de MN en células binucleadas (%)
Control negativo	RPMI completo sin SFB	0	$0,2 \pm 0,091$	$0,0002 \pm 0,0001$
	Baja	0,0025	$6,5 \pm 0,617^*$	$0,006 \pm 0,001^*$
Ácido Iodoacético	Media	0,045	$10,1 \pm 0,876^*$	$0,01 \pm 0,001^*$
	Alta	0,183	$16,65 \pm 1,072^*$	$0,017 \pm 0,001^*$
Control positivo	Etil metano Sulfonato (EMS)	2,26	$15,35 \pm 1,568^*$	$0,015 \pm 0,002^*$
	Total		$9,76 \pm 0,740$	$0,009 \pm 0,001$
valor - p				0,001

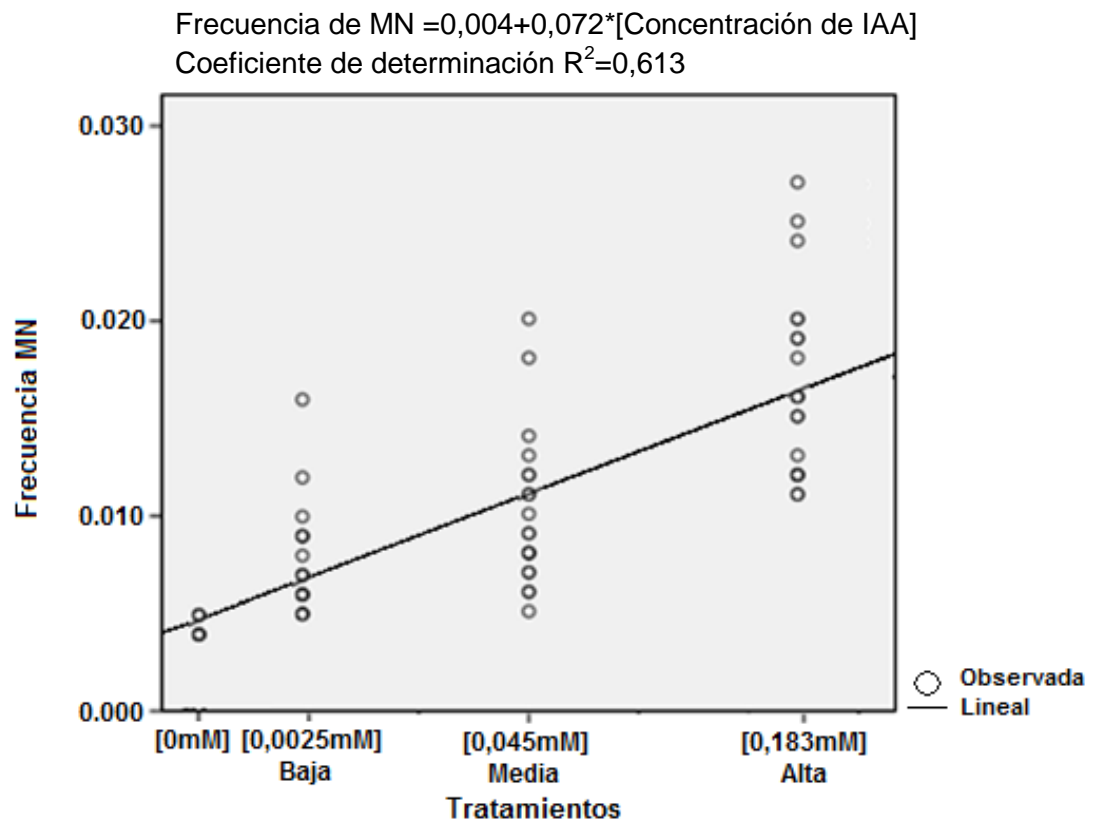
Número de MN fue contado sobre 1000 células BN por tratamiento.

\*  $p < 0,05$  respecto al control negativo (prueba de ANOVA)

Se identificó una asociación lineal positiva, estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ), mediante la prueba de asociación de Pearson, evidenciando un efecto concentración-respuesta, lo cual indica que un aumento en la concentración del IAA incrementa la frecuencia de MN como se muestra en la figura 7. La relación

de tipo lineal se describe con la ecuación. Frec. MN= 0,004+0,072\*[Concentración IAA]. El coeficiente de determinación  $R^2 = 0,613$  indica que la variabilidad en el promedio de la frecuencia de MN depende en un 61,3% de la variabilidad en las concentraciones del IAA.

**Figura 7.** Curva de mejor ajuste que explica la asociación lineal positiva, de la genotoxicidad, con un 95% de confianza.



### 8.3 MODULACIÓN DEL POLIMORFISMO EN EL GEN GSTM1 SOBRE EL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

**8.3.1 Modulación del polimorfismo en el gen GSTM1 sobre el efecto citotóxico.** Al evaluar la modulación del polimorfismo del gen GSTM1 en el efecto citotóxico del IAA, se observó que el IDN de los linfocitos con genotipo GSTM1+



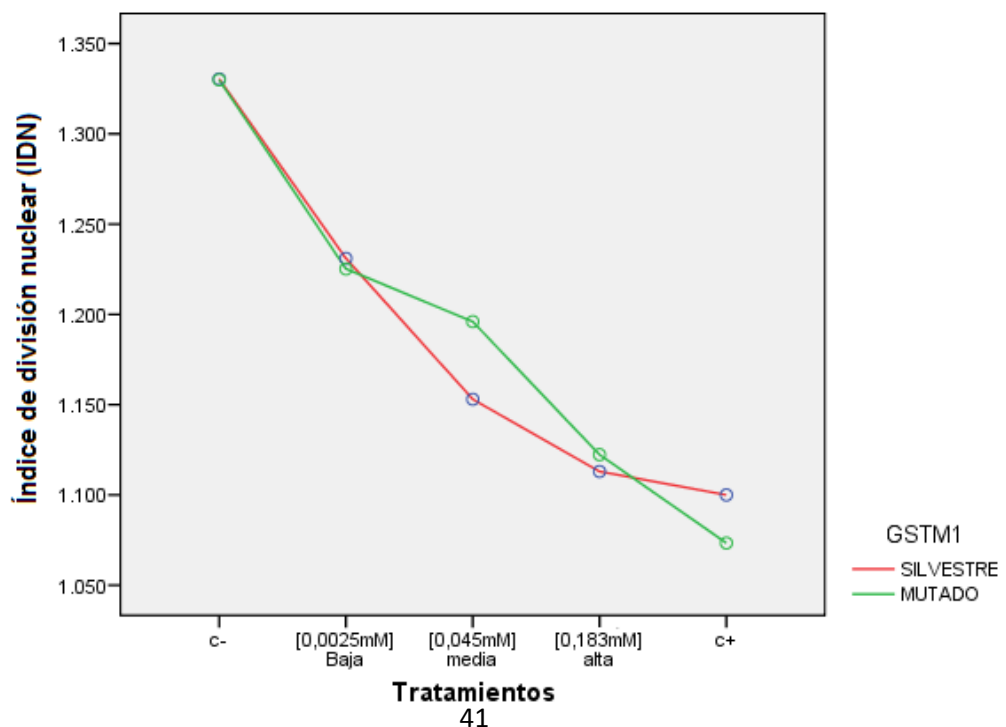
no difiere de los linfocitos con el genotipo GSTM1- para ninguna concentración del IAA ( $p=0,564$ ) (tabla 4 y figura 8).

**Tabla 4.** Índice de división nuclear en linfocitos humanos de sangre periférica con relación a los genotipos GSTM1 tratados con IAA (media  $\pm$  D.S).

Grupos	Subgrupos tratamiento	Concentración (mM)	IDN	
			GSTM1 -	GSTM1+
Control negativo	RPMI completo sin SFB	0	1,3299 $\pm$ 0,01	1,3304 $\pm$ 0,02
Ácido Iodoacético	Baja	0,0025	1,2252 $\pm$ 0,035	1,231 $\pm$ 0,024
	Media	0,045	1,196 $\pm$ 0,039	1,153 $\pm$ 0,018
	Alta	0,183	1,1223 $\pm$ 0,062	1,113 $\pm$ 0,018
Control positivo	Etil metano Sulfonato (EMS)	2,26	1,0734 $\pm$ 0,043	1,1 $\pm$ 0,024
valor - p			0,564*	

\*  $p > 0,05$  entre GSTM1- y el GSTM1+ (prueba de los efectos inter - sujetos)

**Figura 8.** Modulación del gen GSTM1 sobre el efecto citotóxico en linfocitos de sangre periférica tratados con IAA.



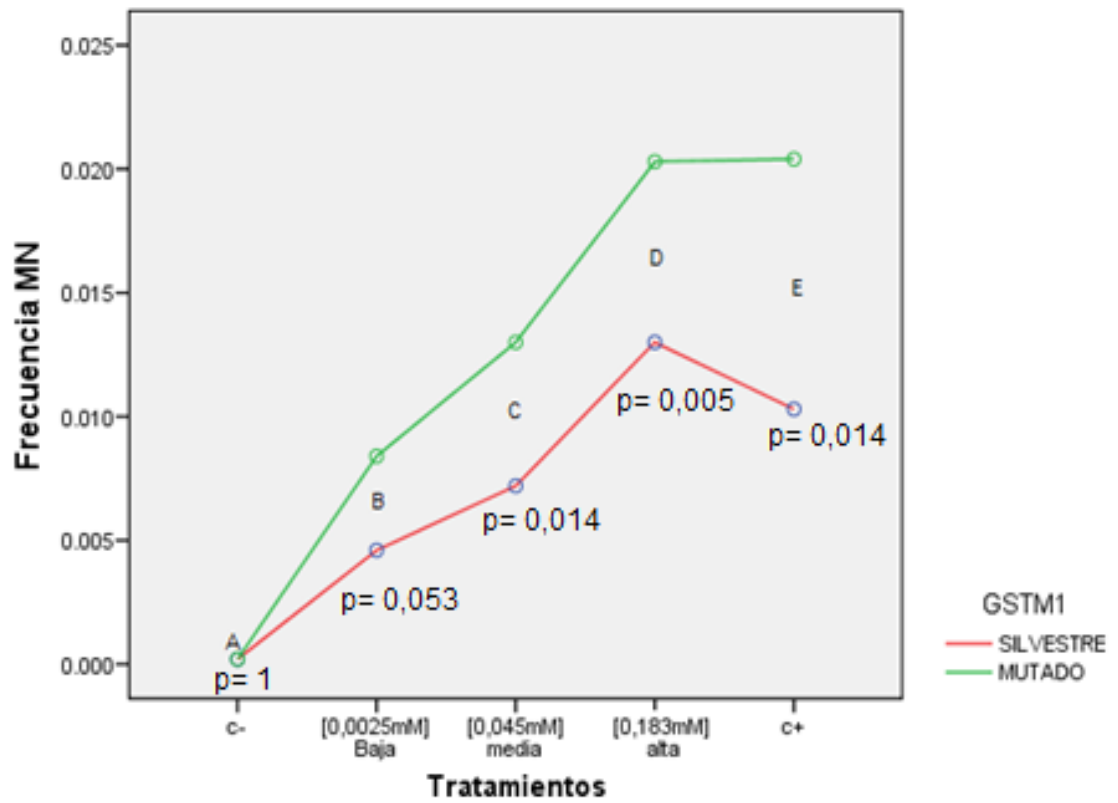
**8.3.2 Modulación del polimorfismo en el gen GSTM1 sobre el efecto genotóxico.** Al evaluar la modulación del polimorfismo del gen GSTM1 con el efecto genotóxico en los cultivos tratados con IAA, se observó que el genotipo GSTM1- presentó una frecuencia de MN superior a la del genotipo GSTM1+ con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ) (Tabla 5). La figura 9 muestra que realmente hay una diferencia estadísticamente significativa a partir de la concentración media.

**Tabla 5.** Frecuencia de MN en linfocitos humanos de sangre periférica y su relación con los genotipos GSTM1 (media  $\pm$  D.S).

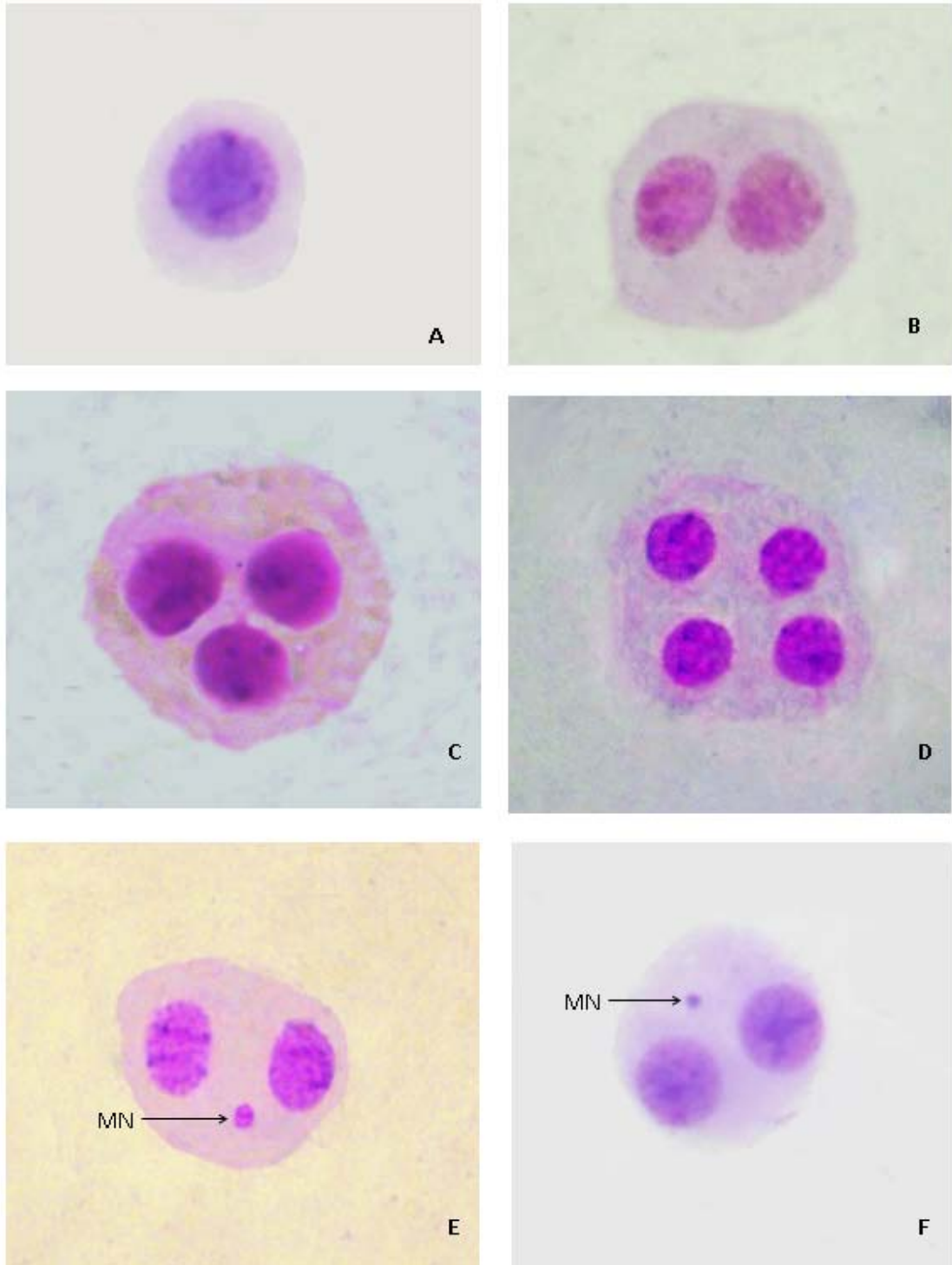
Grupos	Subgrupos tratamiento	Concentración (mM)	Frecuencia de MN	
			GSTM1 -	GSTM1+
Control negativo	RPMI completo sin SFB	0	0,0002 $\pm$ 0,001	0,0002 $\pm$ 0,001
	Baja	0,0025	0,008 $\pm$ 0,003	0,005 $\pm$ 0,001
	Media	0,045	0,013 $\pm$ 0,004	0,007 $\pm$ 0,001
Ácido iodoacético	Alta	0,183	0,203 $\pm$ 0,004	0,013 $\pm$ 0,002
	Etil metano Sulfonato (EMS)	2,26	0,204 $\pm$ 0,006	0,01 $\pm$ 0,003
Control positivo				
valor - p			0,001*	

\*  $p < 0,05$  entre GSTM1+ y GSTM1-. (Prueba de los efectos inter-sujetos)

**Figura 9.** Modulación del gen GSTM1 sobre el efecto genotóxico en linfocitos de sangre periférica tratados con IAA.



**Figura 10.** Registro fotográfico de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis, observados al microscopio óptico (100X). (A) célula mononucleada, (B) célula binucleada, (C) célula trinucleada, (D) célula tetranucleada, (E) y (F) células binucleadas con micronúcleo.



## 9. DISCUSIÓN

La desinfección química del agua representa uno de los mayores logros en la salud pública, a pesar de esto, se han generado daños colaterales causados por la formación de los DBPs (Richardson et al., 2007). Diferentes estudios muestran una asociación entre estos compuestos químicos y su potencial para desarrollar diversas patologías como: cáncer de vejiga y colorrectal además de efectos adversos a nivel reproductivo y en el desarrollo del feto (Cantor et al., 1998). El IAA es uno de los DBPs más citotóxicos y genotóxicos en diferentes líneas celulares, tales como: Bacterias (*Salmonella thypimuriun*), células CHO, linfocitos primarios y en la línea celular HepG2, derivada del tejido hepático humano. (Liviac et al., 2010, Zhang et al., 2010, Pals et al., 2011, Escobar-Hoyos et al., 2013). La mayoría de estudios realizados se han centrado en determinar el potencial citotóxico y genotóxico de aquellos DBPs que han podido ser fácilmente cuantificados en el agua como los THMs, y aunque los HAAs se encuentran en menor concentración, se sabe que generan igual o mayor daño a nivel celular como se evidencian en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Richardson et al., 2007). El IAA actualmente no se encuentra regulado por ninguna de las agencias gubernamentales a nivel mundial, por lo que es necesario ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de toxicidad celular del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica, para que se disminuya la amenaza de daños citotóxicos y genotóxicos inducidos por los DBPs en humanos.

El ensayo de MN con bloqueo de citocinesis usando citocalasina-B (inhibe la polimerización de actina impidiendo la citocinesis), permite realizar una evaluación rápida de los linfocitos humanos de sangre periférica, para determinar el daño inducido por el IAA en el ADN. Además, identifica las células que se han dividido después de la exposición a este agente toxico, porque una vez estas han pasado por un ciclo de división celular pueden expresar micronúcleos (Fenech 1993). Los micronúcleos son material genético no incorporado a las células hijas durante la

división celular, causados por un reparto del material genético no equitativo. Esto se puede generar por la exposición a agentes genotóxicos como los DBPs (Zalacain et al. 2005). También permite evaluar, no sólo la inestabilidad cromosomal, sino también el estado de división celular, reflejado en el número de núcleos presentes (mononucleadas, binucleadas, y células multinucleadas) permitiendo así determinar el IDN (Donmez-Altuntas and Bitgen, 2012). Por lo tanto este ensayo es más exacto, sensible y económico en comparación con métodos convencionales que no distinguen entre células divididas y no divididas (Fenech 1993, Zalacain et al. 2005, Fenech, 2007).

Unas de las ventajas de utilizar el ensayo de MN *in vitro*, es que permite tener total control de las variables a analizar, tales como las concentraciones del IAA y el tiempo de exposición, además esta prueba proporciona información objetiva sobre el mecanismo de acción de un producto o de una sustancia lo que la convierte en un primer paso para evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos, como el IAA, en corto tiempo. (Eisenbrand et al., 2002).

## **9.1 EFECTO CITOTÓXICO**

El índice de división nuclear (IDN) es un biomarcador ampliamente usado para determinar el potencial citostático y citotóxico causado por agentes tóxicos (Fenech et al., 1999, Bonassi et al., 2001). Esta actividad o efecto citostático es inducida por sustancias que causan daño celular y evitan especialmente la proliferación de células de crecimiento rápido, como las células sanguíneas, digestivas y sexuales, teniendo como resultado efectos tóxicos adversos (Isabel 2003).

En nuestro estudio se encontró una asociación concentración-respuesta inversa, entre las concentraciones del IAA y el IDN, con respecto al control negativo, con

una diferencia estadísticamente significativa de  $p=0,001$ , ya que al aumentar las concentraciones del IAA se disminuyó el valor del IDN que va desde 1,33 (control negativo) hasta llegar a un valor de 1,11 (para la concentración alta), muy cercano al valor más bajo posible registrado para el IDN que es de 1,0, el cual se origina cuando todas las células viables no se han logrado dividir (Fenech 2007). Esta disminución en el IDN demuestra que el IAA presenta una actividad citotóxica sobre los linfocitos humanos de sangre periférica, pudiendo alterar la cinética de proliferación celular, como lo hacen otros HAAs, así lo demuestra un estudio realizado por Plewa (2002) en el cual los HAAs bromados y clorados, en células CHO, mostraron la capacidad de disminuir la densidad celular después de las 72h de crecimiento, interrumpiendo el ciclo celular o generando un retraso en el crecimiento celular, sin conllevar a una muerte celular (Plewa et al., 2002, Hebert et al., 2010). Es de tener en cuenta que el IAA a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , resulta ser el más citotóxico en células TK6 con respecto al BAA y al CAA, indicando una actividad citotóxica expresada en el siguiente orden: IAA > BAA >> CAA (Richardson et al. 2007, Liviac et al., 2010). También se conocen estudios en *S. typhimurium* donde el IAA fue 2,9 y 53,5 veces más citotóxico que el BAA y el CAA respectivamente, y una tendencia similar se encontró en células CHO, en el cual el IAA fue 3,2 y 287,5 veces más potente que el BAA y el CAA respectivamente (Plewa et al., 2004).

Nuestros resultados concuerdan con un estudio *in vitro* realizado en linfocitos humanos tratados con el formaldehído, subproducto de la desinfección del agua no halogenado perteneciente al grupo de los aldehídos (Krasner, 1999), en el cual se observó, a concentraciones superiores de 250  $\mu\text{M}$  (0,25mM), un efecto citotóxico, medido como una reducción en el IDN que va desde 1,6 a 1,1 (Schmid and Speit, 2006).

Esta reducción en el IDN también se puede manifestar como consecuencia de la alta genotoxicidad ya que las exposiciones continuas a sustancias tóxicas, como lo podría ser el IAA, y a niveles bajos, puede producir una respuesta adaptativa evidenciada en un incremento de sensibilidad a la apoptosis y/o un retraso más extendido del ciclo celular, esto puede ser debido a que las células con daño celular retrasan el ciclo celular para dar tiempo a reparar el daño inducido inicialmente y evitar así la fijación de las mutaciones durante la replicación del ADN (Bustillos et al, 2012).

En función al número de átomos halógenos asociados a los HAAs, estos tienen un impacto directo sobre los efectos celulares *in vitro*, ya que los monoHAAs como el IAA tienden a presentar una actividad citotóxica más elevada con respecto a los HAAs con más de un átomo halógeno, debido a que los valores del pKa de los ácidos mono a tri van de un rango de 3,5 a 1, incrementando el nivel de ionización (valores de pKa bajos) lo cual se manifiesta como una reducción en la habilidad de los HAAs para atravesar las membranas celulares. Como se demostró en un estudio en células CHO donde el CAA fue 12 y 19 veces más citotóxico que el DCAA y el TCAA, respectivamente (Plewa et al., 2002).

## **9.2 EFECTO GENOTÓXICO**

Los ensayos de genotoxicidad proporcionan datos confiables y eficaces en la evaluación de cambios en el material genético, como resultado de la exposición a agentes con potencial genotóxico en sistemas *in vitro*, evidenciando las alteraciones en el material genético y progresión de enfermedades como el cáncer (Donmez-Altuntas et al, 2012). En los sistemas biológicos en los que se ha evaluado la actividad genotóxica de los DBPs, estos compuestos han inducido en bacterias mutaciones y daños en el ADN en células de mamíferos, provocando la formación de micronúcleos tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" (Richardson et al. 2007).



Otros estudios realizados en Salmonella TA100, en los cuales comparaban diferentes HAAs, entre ellos el IAA, encontraron que este induce 14,129 reversiones/ $\mu\text{mol}$  (Richardson et al. 2007). Al comparar el potencial de mutagenicidad y genotoxicidad en general del IAA con otros ácidos haloacéticos, se obtuvo que en condiciones de preincubación, el IAA es más mutagénico en TA100 que el BAA o el CAA (2,6 veces y 523,3 veces, respectivamente). El IAA fue 2,0 veces más genotóxico que el BAA y 47,2 veces más genotóxico que el CAA en células CHO (Richardson et al. 2007). En un estudio realizado en linfocitos humanos de sangre periférica se determinó que el IAA es 32 veces más genotóxico que el CAA, ya que el IAA a una concentración de  $45\mu\text{M}$  induce un aumento en la frecuencia de ACs, mientras que para generar el mismo daño con el CAA se requiere de una concentración de  $1470\mu\text{M}$  (Escobar-Hoyos et al., 2013).

Para la familia de los HAAs, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), en la evaluación general de carcinógenos para humanos, agrupó al DCAA, al ácido bromocloroacético (BCAA) y al DBAA como posibles cancerígenos para los seres humanos (Grupo 2B), y no presenta clasificación para el TCAA (Grupo 3), ya que la información científica disponible indica que no es posible clasificarlo como un agente cancerígeno (IARC, 2004). La EPA ha clasificado a algunos HAAs, con pruebas suficientes a partir de estudios en animales, pero con falta de información al DCAA como un probable carcinógeno en humanos (Grupo B2), y al TCAA como un posible carcinógeno en humanos (Grupo C) (USEPA, 2004). Es de tener en cuenta que el IAA, que aun no se encuentra regulado ni clasificado por ninguna de las anteriores agencias, ha demostrado tener un mayor potencial de toxicidad con respecto a los HAAs mencionados anteriormente (Zhang et al., 2010, Zhang et al., 2012).

El presente estudio demuestra que la frecuencia de MN de las tres concentraciones del IAA (tabla 3), difieren significativamente de la frecuencia

registrada en el control negativo, lo cual evidencia claramente el potencial genotóxico del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica. Al comparar la frecuencia de MN registrada en los linfocitos tratados con el IAA y la frecuencia basal de MN  $1.5 \pm 1.7$  MN/1000 células BN reportado para individuos sanos, no expuestos a agentes genotóxicos en un estudio caso control (Murgia et al., 2008), se encontró que la frecuencia de MN reportada para las tres concentraciones del IAA superan esta frecuencia basal, lo que corrobora el potencial genotóxico del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica. Así mismo un estudio reciente mediante el ensayo cometa, reportó que la actividad genotóxica generada por el IAA en linfocitos humanos primarios, se evidencia a concentraciones superiores a  $10,43 \mu\text{M}$  ( $0,01043\text{mM}$ ) (Escobar-Hoyos et al., 2013), lo cual demuestra que el ensayo de micronúcleos es un biomarcador sensible para evaluar el potencial genotóxico inducido por el IAA.

El IAA presenta un átomo halógeno, por lo que su número de pKa es elevado, facilitándole atravesar las membranas celulares, así lo corrobora un estudio en el cual se demostró que la familia de los HAAs atraviesan las membranas celulares con mayor facilidad que otros DBPs (Richarson, 2007), esta característica permite que el IAA altere funciones celulares como la glucólisis, inhibiendo de forma irreversible la gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (GAPDH), enzima necesaria en el metabolismo de la glucosa y en la producción de piruvato. La falta de piruvato en la célula conlleva a una interrupción de la cadena de transporte de electrones en presencia de oxígeno y un aumento excesivo en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Cemeli et al. 2006, Pals et al., 2011).

Las EROs aumentan el estrés oxidativo celular y están directamente involucradas en la inducción de genotoxicidad y mutagenicidad, debido a que son especies químicas altamente inestables que pueden interactuar con macromoléculas como el ADN, mediante la escisión oxidativa de la columna azúcar-fosfato, así como la

oxidación de los residuos de purina/pirimidina (Hei and Filipic, 2004). Las EROs constituyen un factor importante en la disminución de la producción intracelular de ATP, que en última instancia induce muerte celular y disfunción mitocondrial (Suna et al., 2009, Pals et al., 2011).

Además el IAA puede generar daño a nivel genético en los linfocitos humanos ya que tiene la capacidad para inducir sitios apurínicos y rupturas en las hebras del ADN en células de mamíferos, sugiriendo que el IAA es el causante de alteraciones durante la replicación y posterior división del ADN en el proceso de división celular, lo que conlleva a la pérdida, bien sea, de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo en los núcleos obteniendo como resultado, la formación de MN (Plewa 2004., Zalacaín et al., 2005.).

Adicionalmente se sabe que los HAAs inducen mutaciones en los sitios AT y sustituciones de bases, en su mayoría transiciones de GC a AT, que al no ser reparados correctamente por la célula, generan inestabilidad genética que en periodos prolongados pueden manifestarse en patologías como el cáncer (Richardson, et al. 2007).

Otra consecuencia de la inhibición del GAPDH causada por el IAA es la alteración de funciones vitales para la célula, tales como fusión de membranas, agrupación de microtúbulos, exportación del ARN nuclear, mantenimiento de la estructura de los telómeros, replicación y reparación del ADN, lo cual explica aún más el potencial del IAA para ejercer efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos de sangre periférica (Sirover, 1999, Sirover, 2005).

### 9.3 MODULACIÓN DEL GEN GSTM1

Los genes de la familia Glutación S-transferasa, presentan los polimorfismos funcionales más estudiados, entre los cuales se encuentra el gen GSTM1, involucrado en la detoxificación de una gran cantidad de sustancias tóxicas, como lo pueden ser los HAAs. Los polimorfismos que presenta los genes de esta familia son de gran importancia en la investigación por su posible interacción en la susceptibilidad al cáncer (Buchard et al., 2007). Como ya se ha visto los monoHAA y en especial el IAA son grandes generadores de estrés oxidativo, el cual es modulado por la Glutacion S-transferasa y asociado con la carcinogénesis del cáncer colorrectal, patología adquirida por la exposición prolongada a este tipo de químicos (Yeh et al., 2010, Kogevinas *et al.*, 2010). Investigaciones previas han demostrado que las personas con polimorfismo en el gen GSTM1, disminuye la capacidad de eliminar sustancias cancerígenas o EROS de la exposición del medio ambiente exógeno o endógeno, que conducen al estrés oxidativo elevado (Yeh et al., 2010).

Nuestros resultados acerca de la interacción del polimorfismo del gen GSTM1 en la inducción de la citotoxicidad, revelan que este polimorfismo no se asoció significativamente ( $p=0,564$ ) con una disminución del IDN (tabla 4) ya que como se observa en la figura 8, no hay diferencias significativas entre los genotipos silvestre y mutado. Mediante un estudio caso control se determinó que la ausencia del gen GSTM1 incrementa levemente (0,21 veces) el riesgo de presentar daño citotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica (Bustillos et al, 2012). Por tanto, el polimorfismo del gen GSTM1 no presenta una modulación sobre el efecto citotóxico en los linfocitos humanos de sangre periférica, tratados con las concentraciones del IAA evaluadas en este estudio.

En relación a la asociación entre el gen GSTM1 y el efecto genotóxico medido por la frecuencia de MN en linfocitos humanos de sangre periférica, nuestros resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ) entre el gen GSTM1+ y GSTM1- (tabla 5). Resaltando el incremento de la frecuencia de MN para el GSTM1-, en las concentraciones media (0,045mM) y alta (0,183mM) como lo muestra la figura 9. Estudios epidemiológicos reportan que el genotipo GSTM1- incrementa significativamente la frecuencia de MN, en linfocitos humanos de sangre periférica, lo cual podría representar riesgo en el desarrollo de cáncer por deficiencia en el proceso de detoxificación (Kumar et al., 2011, Leopardi et al., 2003). También se ha demostrado por medio de un estudio caso control en linfocitos de sangre periférica, que la ausencia del gen GSTM1 incrementa 1,17 veces más la probabilidad de presentar daño cromosómico (Bustillos et al, 2012).

Existen pruebas concluyentes, las cuales demuestran que polimorfismos en los genes GSTM1, NAT2 y una exposición prolongada a los DBPs aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de vejiga (Villanueva et al., 2001a, García-Closas et al., 2005). Otro estudio demuestra que individuos con el genotipo GSTM1- presentan un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de enfermedades neoplásicas, incluyendo el cáncer de vejiga, colorrectal, piel, pulmón y estómago (Losi-Guembarovski et al., 2002). También se sabe que el GSTM1- está implicado en la modificación del estrés oxidativo (Breton et al., 2007, Yeh et al., 2010). Sin embargo un estudio caso control reportó que no hubo una asociación entre el cáncer de vejiga y el gen GSTM1-, afectada por la exposición a DBPs específicamente los THMs (Cantor et al., 2010).

Otros genes como GSTT1, GSTZ1 y CYP2E1, evaluados en un estudio caso-control, influyen en el metabolismo de carcinógenos presentes en la mezcla de DBPs en el agua potable, encontrándose interacción entre los niveles de DBPs y la presencia de los polimorfismos de estos genes. También se determinó que el

gen GSTZ1 transforma varios xenobióticos y sustratos  $\alpha$ -haloácidos (Cantor et al., 2010). Adicionalmente un estudio en roedores, en el cual se evaluó tres HAAs: DCAA, ácido bromocloroacético y el DBAA, obtuvo como resultados que el DCAA causa cáncer de hígado y el DBAA es un carcinógeno multisitio (DeAngelo et al., 1999, Melnick et al., 2007).

Es de tener en cuenta que el cáncer es un proceso multifactorial y por lo tanto la presencia del polimorfismo del gen GSTM1 no siempre es el factor determinante para que se desarrolle este tipo de patologías, ya que por la presencia de otras enzimas metabólicas como el CYP2E1, y demás polimorfismos de la familia GST como el presente en el gen GSTZ1 también pueden jugar un papel importante en la detoxificación de ácidos haloacéticos (Cantor et al., 2006, Bustillos et al, 2012).

Nuestros resultados confirman el potencial citotóxico y genotóxico del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica y dan evidencia del riesgo, que puede presentar la población expuesta, a desarrollar enfermedades como el cáncer colorrectal y de vejiga. Además, se pretende estimular la realización de más estudios con el fin de identificar los tipos de DBPs, el perfil de comportamiento de estos y la concentración a la que se presentan en las plantas de tratamiento, logrando alertar sobre la necesidad de controlar, con medidas de regulación, a los DBPs, o cambiar los métodos de desinfección del agua en los cuales se disminuya la producción de estos compuestos químicos.

## 10. CONCLUSIONES

A partir de los datos generados en este estudio se ha logrado determinar el efecto citotóxico y genotóxico del IAA en linfocitos humanos de sangre periférica, los cuales constituyen eventos causales de inestabilidad genética y aumentan el riesgo a desarrollar cáncer.

Se presentó una disminución en el IDN mostrando que el IAA tiene un efecto citotóxico en los cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica, probablemente como consecuencia de una interrupción en el ciclo celular y en el retraso del crecimiento celular.

El IAA induce efecto genotóxico en los linfocitos humanos de sangre periférica, evidenciado en las concentraciones evaluadas en las cuales se presentó un incremento significativo ( $p=0.001$ ) en la frecuencia de MN con respecto al control negativo.

Se determinó que el IDN no está modulado por la interacción del polimorfismo del gen GSTM1, ya que no hubo diferencia significativa entre los genotipos mutado y silvestre, por otra parte, se observa una modulación de este gen sobre el efecto genotóxico, presentando una mayor frecuencia de MN, a partir de la concentración media (0.045mM), en GSTM1- respecto del GSTM1+.

## 11. RECOMENDACIONES

Es oportuna la realización de este tipo de estudios en los cuales se implemente una tinción diferencial y específica para el ADN, la cual permite tener una mayor certeza en la identificación de MN, dándole así una mayor sensibilidad a la prueba frente al efecto citotóxico y genotóxico.

En investigaciones futuras se recomienda utilizar una muestra más grande de individuos en el momento de trabajar con el polimorfismo evaluado (GSTM1) y posiblemente la inclusión de otros genes involucrados en el metabolismo de los HAAs y control del ciclo celular, entre otros procesos biológicos para así tener mayor claridad sobre el mecanismo de acción del IAA y el papel que desempeñan los factores genéticos en la determinación de la susceptibilidad individual en el desarrollo de problemas de salud.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ascarrunz ME, Tirado N, Gonzáles AR, Cuti M, Cervantes R, Huici O, Jors E. 2006. Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. *Cuad.-Hosp. Clín* 51: 7-18
- Bonassi, S.; Fenech, M.; Lando, C.; Lin, Y. p.; Ceppi, M.; Chang, W. P.; Holland, N.; Kirsch-Volders, M.; Zeiger, E.; Ban, S., 2001. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and molecular mutagenesis*, 37 (1), 31-45.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R. 2006. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28: 625
- Boorman, G. A. 1999. "Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation." *Environmental Health Perspectives* 107(Suppl 1): 207.
- Breton C, Kile-L M, Catalano P, Hoffman E, Quamruzzaman Q, Rahman M., 2007: GSTM1 Genotype Modifies the Association Between Total Urinary Arsenic and the Oxidative Stress Biomarker 8-OHDG *Epidemiology*, 18(5) 20-S21
- Buchard, A., Sanchez, J.J., Dalhoff, K. and Morling, N., 2007. Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene variants: simultaneously detecting GSTM1 and GSTT1 gene copy number and the allelic status of the GSTP1 Ile105Val genetic variant. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 9(5): 612.
- Bustillos, N.T., Ascarrunz, M.E., Aguilar, X. and Rada, A., 2012. Polimorfismos genéticos de la GSTM1 y GSTT1 como modificadores de riesgo mutagénico en agricultores bolivianos expuestos a plaguicidas. *BIOFARBO*, 20(1).
- Cantor KP, Lynch CF, Hildesheim M, Dosemeci M, Lubin J, Alavanja M, Craun G., 1998. Drinking water source and chlorination byproducts I Risk of bladder cancer *Epidemiology*, 9(1):21-28
- Cantor KP, Villanueva C, Garcia-Closas M, Silverman D, Real FX, Dosemeci M, Malats N, Yeager M, Welch R, Chanock S. 2006. Bladder cancer, disinfection byproducts,

- and markers of genetic susceptibility in a case-control study from Spain. *Epidemiology* 17: S150
- Cantor KP, Villanueva CM, Silverman DT, Figueroa JD, Real FX, Garcia-Closas M, Malats N, Chanock S, Yeager M, Tardon A. 2010. Polymorphisms in GSTT1, GSTZ1, and CYP2E1, disinfection by-products, and risk of bladder cancer in Spain. *Environmental health perspectives* 118: 1545
- Castell, J.V., 2004. El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos.
- Cemeli, E., Wagner, E.D., Anderson, D., Richardson, S.D. and Plewa, M.J., 2006. Modulation of the cytotoxicity and genotoxicity of the drinking water disinfection byproduct iodoacetic acid by suppressors of oxidative stress. *Environmental science & technology*, 40(6): 1878-1883.
- Çelik M, Ünal F, Yüzbaşıoğlu D, Ergün MA, Arslan O, Kasap R. 2005. In vitro effect of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes. *Mutagenesis* 20: 101-4
- DeAngelo AB, George MH, House DE. 1999. Hepatocarcinogenicity in the male B6C3F1 mouse following a lifetime exposure to dichloroacetic acid in the drinking water: dose-response determination and modes of action. *J Toxicol Environ Health A.*; 58 :485–507.
- Del Arco, C., 1997. Metabolismo de los fármacos. *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson SA Barcelona, España: 73-85.
- Donmez-Altuntas, H. and Bitgen, N., 2012. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation research*.
- Doyle TJ, Zheng W, Cerhan JR, Hong CP, Sellers T, Kushi L, Folsom A. 1997. The association of drinking water source and chlorination by-products with cancer incidence among postmenopausal women in Iowa: a prospective cohort study. *American Journal of Public Health* 87: 1168-76
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and molecular mutagenesis*, 13(1): 34-43.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology* 40: 193-236

- Escobar-Hoyos LF, Hoyos-Giraldo LS, Londoño-Velasco E, Reyes-Carvajal I, Saavedra-Trujillo D, Carvajal-Varona S, Sánchez-Gómez A, Wagner ED, Plewa MJ., 2013. Genotoxic and clastogenic effects to monohaloacetic acid drinking water disinfection by-products in primary human lymphocytes. *Water research* (0).
- Fenech, M. and Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1–2): 29-36.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101(Suppl 3): 101.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E. and Bonassi, S., 1999. The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1-2): 271-283.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5): 1084-1104.
- García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R., 2005. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses *Lancet*, 366(9486):649
- Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I. 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Research* 54: 2919
- Hebert A, Forestier D, Lenés D, Benanou D, Jacob S, Arfi C, Lambomez L, Levi Y. 2010. Innovative method for prioritizing emerging disinfection by-products (DBPs) in drinking water on the basis of their potential impact on public health. *Water research* 44: 3147-65
- Hei, T.K. and Filipic, M., 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5): 574-581.
- IARC, 2004. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. In: some Drinking-water Desinfectants and contaminants, Including Arsenic, vol. 84. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- Isabel, G., 2003. Agentes Citostáticos. MSC, © Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Jimenez, M.R. and kuhn, G.R., 2009. I. 1. Reacciones de oxidación. Toxicología fundamental: 118
- Kauppinen T, Toikkanen J, Pedersen D, Young R, Ahrens W, Boffetta P, Hansen J, Kromhout H, Blasco JM, Mirabelli D. 2000. Occupational exposure to carcinogens in the European Union. *Occupational and environmental medicine* 57: 10
- Kogevinas M, Villanueva CM, Font-Ribera L, Liviác D, Bustamante M, Espinoza F, Nieuwenhuijsen MJ, Espinosa A, Fernandez P, DeMarini DM. 2010. Genotoxic effects in swimmers exposed to disinfection by-products in indoor swimming pools. *Environmental Health Perspectives* 118: 153
- Krasner Stuart W., 1999. "Formation and Control of Disinfection By-Products in Drinking Water", Chapter two: "Chemistry of Disinfection By Products Formation" , pp 27-52, American Water Works Association,
- Kumar A, Yadav A, Giri SK, Dev K, Gautam SK, Gupta R, Aggarwal N. 2011. Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes and confounding factors on the frequency of sister chromatid exchange and micronucleus among road construction workers. *Chemosphere* 84: 564-70
- Laboratorio, IVONNE BERNIER, 2011 Análisis Físicoquímico de Aguas, Bogota.
- Leopardi P, Zijno A, Marcon F, Conti L, Carere A, Verdina A, Galati R, Tomei F, Baccolo T, Crebelli R. 2003. Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: Effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environmental and molecular mutagenesis* 41: 126-30
- Liviác, D., Creus, A. and Marcos, R., 2010. Genotoxicity testing of three monohaloacetic acids in TK6 cells using the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 25(5): 505-509.
- Losi-Guembarovski, R., D Arce, L.P.G. and de Syllos Cólus, I.M., 2002. Glutathione S-transferase mu (GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population. *Genetics and molecular biology*, 25: 357-360.
- Mateuca, R., Lombaert, N. and Kirsch-Volders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11): 1515-1531.

- Melnick RL, Nyska A, Foster PM, Roycroft JH, Kissling GE., 2007. Toxicity and carcinogenicity of the water disinfection byproduct, dibromoacetic acid, in rats and mice. *Toxicology.*; 230 (2–3):126–136.
- Murgia, E., Ballardin, M., Bonassi, S., Rossi, A.M. and Barale, R., 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case–control study. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 639(1–2): 27-34.
- Nieuwenhuijsen, M.J., Toledano, M.B., Eaton, N.E., Fawell, J. and Elliott, P., 2000. Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occupational and environmental medicine*, 57(2): 73.
- Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149(1–3): 309-334.
- OMS, 2004. Estandares de regulación para subproductos de desinfección.
- Pals, J.A., Ang, J.K., Wagner, E.D. and Plewa, M.J., 2011. Biological Mechanism for the Toxicity of Haloacetic Acid Drinking Water Disinfection Byproducts. *Environmental science & technology*, 45(13): 5791-5797.
- Parl, F.F., 2005. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Letters*, 221(2): 123-129.
- Plewa, M.J., Kargalioglu, Y., Vankerk, D., Minear, R.A. and Wagner, E.D., 2002. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environmental and molecular mutagenesis*, 40(2): 134-142.
- Plewa, M.J., 2004. Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity of New Drinking Water Disinfection By-Products.
- Plewa MJ, Wagner ED, Richardson SD, Thruston Jr AD, Woo YT, McKague AB. 2004. Chemical and biological characterization of newly discovered iodoacid drinking water disinfection byproducts. *Environmental science & technology* 38: 4713-22
- Ramos, D.F.d.L., 2007. Influência de polimorfismos genéticos de glutatióno S-transferases na indução de micronúcleos em linfócitos humanos após exposição in vitro à doxorubicina.
- Resolucion 2115 del 2007. ministerio de protección social. ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Características, instrumentos básicos y frecuencias

del sistema de control y vigilancia para el control de la calidad del agua para consumo humano.

- Rebbeck, T. R., 1997. "Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 6(9): 733-743.
- Richardson, S.D., Simmons, J.E. and Rice, G., 2002. Disinfection byproducts: the next generation. *Environmental science & technology*, 36(9): 198A-205A.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R. and DeMarini, D.M., 2007. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 636(1-3): 178-242.
- Rivera León E., Macías Carballo M., Palmeros Sánchez B. and Fernández M., 2009. Biomonitores: desenmascarando a los tóxicos. revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana, xxiii.
- Rodríguez, M. J., G., Rodríguez, G., Serodes, J. and Sadiq, R., 2007. Subproductos de la desinfección del agua potable: formación, aspectos sanitarios y reglamentación. *Interciencia* 32(011): 749-756.
- Sadiq, R. and M. J. Rodriguez, 2004. "Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: a review." *Science of The Total Environment* 321(1-3): 21-46.
- Schmid, O. and Speit, G., 2006. Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 22(1): 69-74.
- Sirover, M.A., 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1432(2): 159-184.
- Sirover, M.A., 2005. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *Journal of cellular biochemistry*, 95(1): 45-52.
- Strange, R.C., Jones, P.W. and Fryer, A.A., 2000. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 112–113(0): 357-363.

- Suna H, Arai M, Tsubotani Y, Hayashi A, Setiawan A, Kobayashi M. 2009. Dysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17: 3968-72
- USEPA. 2004. Office for Water. Drinking Water Standards and Health Advisories, EPA 822-R-04-005 Washington, DC. Winter 2004.
- Villanueva, C.M., Kogevinas, M. and Grimalt, J.O., 2001a. Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga.
- Villanueva, C.M., Kogevinas, M. and Grimalt, J.O., 2001b. Cloración del agua potable y efectos sobre la salud: revisión de estudios epidemiológicos. *Med Clin (Barc)*, 117(1): 27-35.
- Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Castano-Vinyals G., 2007. Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering, and swimming in pools. *American journal of epidemiology*, 165(2):148-156.
- Xie, Y., 2004. *Disinfection Byproducts in Drinking Water: Formation Analysis and Control*, Boca Raton - Florida, 176 pp.
- Yeh, C.C. et al., 2010. Protein carbonyl levels, glutathione S-transferase polymorphisms and risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31(2): 228-233.
- Yeh CC, Lai CY, Hsieh LL, Tang R, Wu FY, Sung FC. 2010. Protein carbonyl levels, glutathione S-transferase polymorphisms and risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31: 228-33
- Zalacain, M., Sierrasesumaga, L. and Patino, A., 2005. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *SciELO Espana*, pp. 227-236..
- Zhang S-H, Miao D-Y, Liu A-L, Zhang L, Wei W, Xie H, Lu W-Q. 2010. Assessment of the cytotoxicity and genotoxicity of haloacetic acids using microplate-based cytotoxicity test and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 703: 174-9
- Zhang L, Xu L, Zeng Q, Zhang SH, Xie H, Liu AL, Lu WQ. 2012. Comparison of DNA damage in human-derived hepatoma line (HepG2) exposed to the fifteen drinking water disinfection byproducts using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 741: 89-94

## ANEXOS

### Anexo A. Consentimiento informado

\_\_\_\_\_ con cédula de ciudadanía \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ persona mayor de edad, he sido informada que el grupo de **INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA** de la Universidad del Cauca realizará el estudio “**Identificación de la citotoxicidad y genotoxicidad de un subproducto de la desinfección del agua (ácido yodoacético), evaluadas mediante el índice de división nuclear y la frecuencia de micronúcleos con la asociación al polimorfismo del gen GSTM1, en cultivos de linfocitos humanos**”

**OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO:** El objetivo del estudio es determinar mediante ensayos in vitro, los efectos citotóxicos y genotóxicos, inducidos por el ácido yodoacético (subproducto de la desinfección del agua) en cultivos de linfocitos humanos y la modulación por el polimorfismo del gen del metabolismo GSTM1. El propósito será evaluar cambios en la frecuencia de micronúcleos producidos por la exposición al subproducto de la desinfección del agua, con el fin de aportar conocimientos en cuanto a las propiedades genotóxicas y carcinógenas de estas sustancias químicas, poco estudiadas en nuestra región, para adoptar medidas de prevención.

**HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO:** En este estudio serán seleccionados 1 hombre con una delección en el gen GTTM1 y 1 hombre con la presencia normal de este mismo gen, con el fin de conocer al momento del análisis de los resultados, los efectos citotóxicos y genotóxicos de este cambio en el genotipo. El propósito de la investigación tiene relevancia social y científica y obedece a una problemática de salud ambiental. El estudio se desarrollará como una estrategia en la búsqueda de mecanismos que disminuyan el impacto de la exposición a altas concentraciones del ácido yodoacético como subproducto de la desinfección del agua, el cual es uno de los factores de riesgo para generar cáncer de vejiga y colorrectal menos estudiados a nivel nacional y mundial.

Sobre la competencia, formación y calidad de los investigadores es responsable la Universidad del Cauca. Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados al grupo y para efectos de publicación los resultados se representarán en forma anónima.



**REQUERIMIENTOS:** en pleno uso de mis facultades mentales, libre y consciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que éste requiere de mí lo siguiente: Contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos, para suministrar información personal referente a mi edad, estado de salud y estilo de vida. Si soy seleccionado para el estudio debo donar 10 cm<sup>3</sup> de sangre periférica obtenida de mi brazo mediante punción venosa. Las muestras serán procesadas en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para la prueba de Micronúcleos e identificación de polimorfismos genéticos. El ADN restante será criopreservado en el laboratorio del Grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca durante cinco años, para posteriores investigaciones las cuales contarán con el previo aval del Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca. El ADN no será usado para ningún tipo de discriminación laboral, racial, política, social y económica, ni para investigaciones futuras.

**RIESGOS DE PARTICIPACIÓN:** Los riesgos potenciales de participación en el estudio son sangrado e infección en el sitio de la toma de la muestra de sangre, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de muestras biológicas, y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y uso de implementos estériles nuevos. Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se darán a conocer en forma grupal más no individual en un seminario, con el propósito de hacer una autoreflexión, luego de haber recibido una serie de conferencias. Tengo claro que no se me proveerá con ninguna compensación económica.

**BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE:** Atender a cursos de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por exposición a los subproductos de la desinfección del agua. Conocer los resultados del estudio.

**ENTIENDO QUE:** Mi participación es completamente voluntaria y que puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo o puedo tomar libremente la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal. La información recolectada será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de otros participantes para obtener resultados grupales. La Universidad del Cauca se compromete a vigilar que las muestras biológicas sean tomadas en un contenedor apropiado para tal fin y en forma aséptica para evitar complicaciones.

Tengo claro que no se me proveerá con ninguna compensación económica. Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante o después del estudio, a la Docente Nohelia Cajas Salazar de la Universidad del Cauca responsable del estudio, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética en la carrera 2<sup>o</sup> No. 1<sup>a</sup> 25 Barrio Caldas, Popayán, en los teléfonos 8209800 Ext. 2643. La firma del documento del consentimiento informado es

requerida para todas las personas participantes en un estudio como este. Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje claro que yo he podido entender.

También entiendo que como mi nombre no será vinculado con los resultados del estudio, la docente Nohelia Cajas Salazar y el personal a cargo del proyecto no estarán en la posibilidad de informar a ninguna persona sobre mis resultados de las pruebas. Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se dé a conocer mi nombre.

He leído este consentimiento, he entendido en qué consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el trabajo de grado **“Identificación de la citotoxicidad y genotoxicidad de un subproducto de la desinfección del agua (ácido yodoacético), evaluadas mediante el índice de división nuclear y la frecuencia de micronúcleos con la asociación al polimorfismo del gen gstm1, en cultivos de linfocitos humanos”**

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

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

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo N° 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo N° 1

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo N° 2

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo N° 2

\_\_\_\_\_  
Nohelia Cajas Salazar. Director del proyecto

## ANEXO B. Encuesta

Favor responder las siguientes preguntas de forma sincera, clara y concreta

LUGAR	FECHA	DD	MM	AA	CODIGO	ENCUESTADOR

### I. INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre Completo		Estado Civil	1. Soltero	2. Casado	
Dirección		Sexo	1. M	2. F	
Teléfono		Edad (años)			
Lugar de Nacimiento		Nivel de Educación	Primaria	Secundaria	Universitaria

### II. INFORMACIÓN SOBRE EL ESTADO DE SALUD

#### Tratamiento por enfermedad

¿Ha tenido enfermedades que no han requerido hospitalización?				¿Ha tenido enfermedades que han requerido hospitalización?			
Enfermedad	SI	NO	Tipo de Tto	Enfermedad	SI	NO	Tipo de Tto

¿Ha tenido problemas de salud?		SI			NO					
Enfermedad	SI	NO	Tratamiento			Enfermedad	SI	NO	Tipo	
1. Hepatitis			A	B	C	3. Herpes			Labial	Genital
2. Meningitis			Viral	Bacterial		4. Cancer				
Otras ¿Cuáles?										

¿Consume algún tipo de Medicamento?		SI			NO		
Medicamento	SI	NO	Dosis	Desde	Hasta	Actualmente	
				dd-mm-aa	dd-mm-aa	dd-mm-aa	
Otros ¿Cuáles?							

**En su familia existen problemas de salud? (abuelos, padres, hijos, tíos, primos, etc.)**

Trastorno	Parentesco	Descripción				
		SI	NO	# Casos		Tipo
1. Malformaciones de Nacimiento	Papá					
	Mamá					
	Hermano (a)					
	Tío (a)					
	Sobrino (a)					
2. Mongolismo o Síndrome de Down	Papá					
	Mamá					
	Hermano (a)					
	Tío (a)					
	Sobrino (a)					
3. Abortos espontaneos/nacimientos de un niño muerto, partos prematuros	Papá					
	Mamá					
	Hermano (a)					
	Tío (a)					
	Sobrino (a)					
4. Esterilidad	Papá					
	Mamá					
	Hermano (a)					
	Tío (a)					
	Sobrino (a)					

### III. INFORMACIÓN SOBRE EL HÁBITO DE FUMAR ACTUAL.

Consumo/cigarrillo	SI	NO	Cigarrillos/día					Meses Fumando	Meses sin Fumar	Observaciones
			<10	10-20	20-40	40-60	> 60			
1. Fumador										
2. Exfumador										
3. No Fumador										

### IV. INFORMACIÓN SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL

Tipo	SI	NO	Días/Semanas	Días/mes
1. Aguardiente				
2. Cerveza				
3. Ron				
4. Brandy				
5. Whisky				
6. Guarapo				
7. Vino				

## V. INFORMACIÓN SOBRE EL CONSUMO DE DROGAS PSICOACTIVAS

Tipo	SI	NO	Ex - Consumidor	Años	Meses	Frecuencia		
						Diario	Semanal	Mensual
1. Marihuana								
2. Cocaína								
3. Basuco								
4. Heroína								
5. Morfina								
6. Éxtasis								
7. Otras								

## VI. INFORMACIÓN SOBRE HáBITOS ALIMENTICIOS Y NUTRICIÓN

EDAD							
1. Entre 18 y 30 años		2. Entre 30 y 50 años		3. Mas de 50 años			
MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS							
1. Estatura		2. Peso					
INFORMACIÓN SOBRE HáBITOS ALIMENTICIOS							
¿Cuántas comidas consumen al día?							
1) 1 o 2		2) 3 o 4		3) 4 o 5		4) Mas de 5	
¿Qué tipo de alimentos consume en sus comidas?							
1. Harinas		2. Frutas		3. Verduras		4. Lacteos	
						5. Carnes	
						6. Grasas	
INFORMACIÓN NUTRICIONAL							
CONSUMO DE FRUTAS							
¿Cuántas frutas consumen al día en sus comidas?							
1) 1 o 2		2) 3 o 4		3) 4 o 5		4) Mas de 5	
						5) Poco consumo al mes	
¿Qué tipo de frutas consume?							
1. Mango		2. Guayaba		3. Papaya		4. Limon	
						5. Uvas	
						6. Manzana	
7. Piña		8. Naranja		9. Banano		10. Pera	
						11. Otras	
CONSUMO DE VERDURAS/Hortalizas							
¿Cuántas verduras/hortalizas consume al día en sus comidas?							
1) 1 o 2		2) 3 o 4		3) 4 o 5		4) Mas de 5	
¿Qué tipo de Verduras consume al día en sus comidas?							
1. Espinaca		2. Lechuga		3. Acelga		4. Coliflor	
						5. Tomate	
						6. Ajo	

7.Cebolla	8.Remolacha	9.Zapallo	10.Broccoli	11.Zanahoria	12.Otros
CONSUMO DE CARNE					
¿Cuántas veces al día consume carnes en sus comidas					
1.Una	2.Dos	3.Tres	4.Mas de 4		
¿Qué tipo de carnes consume?					
1.Res	2.Cerdo	3.Pollo	4.Cordero	5.Pescado	6.Pavo
¿En que tipo de preparaciones las consume?					
1.Frito	2.Asado	3.Vapor	4.Cocido		
CONSUMO DE GRASAS					
¿Consumo Grasas en sus comidas?				Si	No
¿Qué tipo de grasas consume?					
1.Aceite	2.Mantequilla	3.Mantequilla	4.Piel animal	5.Aguacate	Otros
¿Consumo granos o legumbres en sus comidas?				Si	No
¿Con que frecuencia?		1) 1 o 2	2) 3 o 4	3) 4 o 5	4) Mas de 5
¿Qué tipo de legumbres consume?					
1.Arveja	2.Frijol	3.Lenteja	4.Garbanzo	Otros	
¿Qué tipo de bebidas consume?					
1.Cafe	2.Te	3.Gaseosa	4. Jugos en agua	5. Jugos en leche	
¿Toma las bebidas con o sin azúcar				Con	Sin

¿Consumo alimentos con Sal?	Si	No	Muy poco	Suficiente
¿Consumo agua?			Si	No
¿Cuántos vasos de agua al día?	1) 1 O 2		2) 3 O 4	3) Mas de 5
Asiste a piscinas	SI	NO	Con que frecuencia	