

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO EN CÉLULAS DEL EPITELIO
BUCAL EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA A SOLVENTES ORGÁNICOS
EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

JHON JAIRO BETANCOURTH PAREDES

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIA NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL
EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA A SOLVENTES ORGÁNICOS EN EL
DEPARTAMENTO DEL CAUCA

JHON JAIRO BETANCOURTH PAREDES

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

DIRECTOR

ALDAIR BERYERY ROSERO CALDON

CODIRECTORA

LUZ STELLA HOYOS

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIA NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2018

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	8
3. MARCO TEORICO	11
3.1 Solventes orgánicos.....	11
3.2 Especies reactivas de oxígeno y lesiones en el ADN.....	11
3.3 La mucosa bucal.....	11
3.4 Biomonitorio humano.....	12
3.5 Biomarcadores.....	12
3.5.1 Biomarcadores de exposición.....	12
3.5.2 Biomarcadores de susceptibilidad.....	12
3.5.3 Biomarcadores de efecto.....	12
3.6 Micronúcleos y significancia biológica.....	13
3.6.1 Ensayo de micronúcleos como predictor de riesgo a cáncer.....	13
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. ANTECEDENTES.....	16
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	17
6.1 Tipo de estudio.....	17
6.2 Población objeto de estudio.....	17
6.3 Selección de la población.....	18
6.3.1 Criterios de inclusión y exclusión.....	18
6.4 Tamaño de la muestra.....	18
6.5 Prueba de micronúcleos.....	18
6.5.1 Registro de micronúcleos y brotes nucleares.....	19
6.6 Análisis de datos.....	19
7. RESULTADOS.....	20

8. DISCUSIÓN24
9. CONCLUSIONES27
REFERENCIAS28

RESUMEN

La exposición ocupacional a solventes orgánicos en los pintores de vehículos automotrices, es uno de los factores que ha influenciado el desarrollo de cáncer, debido a que los trabajadores frecuentemente están expuestos a compuestos químicos con alto contenido de agentes mutágenos, clastógenos, carcinógenos y teratógenos. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo y en el año el año 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones. Esta problemática ha generado el interés por la implementación y desarrollo de estudios de biomonitorio sobre la salud humana, por ser una herramienta útil para la detección temprana del efecto biológico producido por la exposición ambiental y ocupacional a agentes tóxicos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el estado genotóxico en células exfoliadas del epitelio bucal en 120 personas sanas del departamento del Cauca, 60 personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos y 60 controles, los cuales se seleccionaron previamente. Las muestras de células del epitelio bucal fueron tomadas de las dos mejillas de cada participante, realizando un suave masaje con un cepillo citológico nuevo y estéril, luego se pasaron a un tubo falcón con 5ml de solución salina y se refrigeraron, estas muestras fueron procesadas y teñidas con la coloración diferencial de feulgen fast Green. Los resultados obtenidos evidenciaron que la exposición ocupacional a solventes orgánicos influyó significativamente ($p < 0,001$), en el aumento de la frecuencia de micronúcleos y de brotes nucleares en la población expuesta con relación al grupo control. Cuándo se categorizo el tiempo de exposición se evidencio un aumento significativo en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad, mientras que para la edad se mostró una tendencia al aumento en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad a medida que el tiempo de exposición y edad aumentaba. Conclusión. El aumento en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad en las células exfoliadas del epitelio bucal, demostró los efectos clastogénicos de la exposición ocupacional a solventes orgánicos. La edad y el tiempo de exposición fueron factores que influyeron en el aumento de la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad.

Palabras claves: biomonitorio, micronúcleos, exposición ocupacional, cáncer, células bucales, ensayo citoma de micronúcleos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición ocupacional a solventes orgánicos por parte de los pintores de vehículos automotrices, es uno de los factores que está involucrado en la aparición de cáncer. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo y en el año 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones (OMS, 2017). En el continente americano se estima que 2,8 millones de personas son diagnosticadas cada año y que 1,3 millones de personas mueren anualmente por esta enfermedad, específicamente para América Latina y el Caribe, se reporta aproximadamente 1,2 millones de nuevos casos de cáncer cada año y alrededor de 600.000 muertes. Además, se estima que esta situación empeorará para el año 2030, donde habrá un incremento del 65% de nuevos casos y un 75% en la tasa de mortalidad (OMS; OPS, 2017). Según la OMS, en Colombia en el año 2014 se presentaron cerca de 71.000 nuevos casos de cáncer y para el año 2035 se tiene proyectado cerca de 150.000 casos de cáncer nuevos por año (OMS, 2014). Para la OMS, el 19% de los cánceres que se produjeron en el año 2015 estuvieron relacionados con las condiciones del medio ambientales y laborales, este hecho se atribuye en gran magnitud a la falta de servicios de salud ocupacional en los países en vía de desarrollo, en donde más del 85% de los trabajadores de empresas pequeñas, del sector no estructurado, el sector agrícola y los migrantes no tienen ningún tipo de cobertura de salud ocupacional, por esta razón, cerca del 70% de las muertes por cáncer se registran en países de medios y bajos ingresos (OMS, 2014 ;CCS, 2015).

Esta cáncer ha afectado a los pintores de vehículos automotrices, debido a que estos trabajadores frecuentemente se exponen a sustancias orgánicas como thinner y pintura a base de poliuretano, sin ninguna medida de protección que prevenga sus efectos (Vitali et al. 2006; Palma et al. 2015). La Agencia de Protección Ambiental, describe al thinner y a las pinturas utilizadas en los vehículos, como mezclas complejas de solventes orgánicos, en las que se hallan diversidad de compuestos químicos como benceno, tolueno, isobutano, m-xileno, hexano, noveno, dimetilexano, etilbenceno, p-xileno, octano, o-xileno y otros compuestos con masas < 1% (Hoyos-Giraldo et al., 2009). El benceno y el etilbenceno son considerados como potentes agentes mutágenos, clastógenos, carcinógenos y teratógenos (Swanepoel, 2004; OMS, 2014), debido a que tienen ciertas propiedades físico-químicas, como una elevada presión de vapor (volatilidad) y bajo punto de ebullición, que facilitan su absorción en el cuerpo; además su bajo peso molecular y el carácter apolar los hacen más difíciles de ser metabolizados (Axelson y Hogstedt 1994, Snyder y Andrews, 1996, Löf y Johanson 1998). Una vez ingresan al cuerpo, estas sustancias son sometidas a un proceso de biotransformación, con la finalidad de dar origen a productos intermedios más hidrosolubles y polares que sean menos reactivos (detoxificación) y así permitir su excreción a través de la orina.

Sin embargo, estas reacciones pueden generar productos intermedios, aún más tóxicos que el compuesto parental (bioactivación), como los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Costa et al., 2006, Mattia et al., 1991). Estas últimas son altamente reactivas y pueden interactuar con el material genético causando lesiones primarias con bases oxidadas, sitios abásicos y rupturas de cadena sencilla o doble en la estructura del ADN (Ross, 2001). Las implicaciones biológicas de las lesiones en el ADN dependerán de la capacidad de respuesta y los procesos de reparación del mismo en cada persona. En caso de no ser reparadas o no tener la capacidad de llevar a la célula a un proceso apoptótico, las lesiones podrían fijarse para dar origen a una acumulación de mutaciones en células somáticas y/o en mutaciones en células germinales y provocar así enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer (Bonassi et al. 2001).

A pesar de que se han realizado estudios todavía falta una importante base de conocimiento para que los resultados sean implementados con el fin de disminuir la exposición y sus consecuencias en la salud. Teniendo en cuenta este panorama, el presente estudio se llevó a cabo con el propósito de evaluar el potencial producido por la exposición crónica a solventes orgánicos en pintores de vehículos automotores, utilizando el biomarcador de efecto de micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal.

Tomando en cuenta lo anterior, se plantearon las siguientes preguntas de investigación, ¿cuál es la frecuencia de los biomarcadores de efecto genotóxico? Si es así ¿existen variables de la exposición que modulan la frecuencia de los biomarcadores en la población?

2. JUSTIFICACIÓN

La orientación actual de la producción de pinturas automotrices está dirigida hacia la reducción del contenido de disolventes, se sabe que muchos países tienen un valor máximo de solventes orgánicos permisible para determinadas pinturas (Restrepo, 2007). Las normativas europeas para la importación y comercialización de productos con solventes orgánicos prohibieron, a partir del 1 de enero de 2007 la comercialización de cualquier producto con valores de solventes orgánicos superior al máximo permitido (CESVI COLOMBIA, 2017). La situación del mercado de pinturas automotrices en países latinoamericanos como Colombia se caracteriza por una preponderancia por los productos con alto contenido de solventes orgánicos, por ser económicos y de fácil obtención (Restrepo, 2007). Debido a esto en la actualidad no existe en el país una normatividad que prohíba la importación y la comercialización de productos porque no se han establecido límites permisibles de solventes orgánicos en pinturas automotrices (CESVI COLOMBIA, 2017). El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible ha tenido avances en la materia, para junio del 2008 expidió la Resolución 0909, en la cual se establecen las normas y estándares de emisión admisibles de contaminantes a la atmósfera por fuentes fijas mas no se contemplan valores máximos permisibles en la emisión de solventes (MINAMBIENTE, 2013).

En nuestro país, esta situación tiene alta complejidad debido a que los trabajadores pintores de carros se exponen directamente a los solventes orgánicos, por falta de conocimientos previos que les permita comprender los efectos adversos producidos por estos químicos y así exigir a los empleadores implementar medidas para prevenir accidentes y enfermedades laborales. El desconocimiento de los efectos adversos de los solventes orgánicos parte del nivel educativo de los trabajadores. En Colombia, la proporción de personas de la población económicamente activa (PEA) que terminan sus estudios es baja, para el año 2016 habían completado la educación media el 32,9% de la población, mientras que el 6,0% había completado la educación básica secundaria y el 23,3% la educación básica primaria (DANE, 2016).

La mayoría de empleadores del sector informal al no sentir presión por parte de los empleados, toman la implementación servicios de salud ocupacional como un sobre costo y no una inversión que trae beneficios para el empleado y para el empleador, por no comprender que el mejoramiento en las condiciones ocupacionales conlleva a un aumento en la productividad y al mismo tiempo disminuye el ausentismo laboral y los costos por indemnizaciones que se deben pagar por los accidentes y enfermedades laborales (César G. Lizarazoa, fajardo, berrio, & Quintanaa, 2010). Las estadísticas de crecimiento del Sistema de Riesgos Laborales en el país muestran que con el paso de los años no se ha evidenciado crecimiento significativo en la implementación de estos servicios con respecto al crecimiento de los trabajadores informales. De aproximadamente 3,5

millones de trabajadores afiliados en el año 1994 se pasó a tener 9 millones en el año 2014 (CCS, 2014). Se calcula que en Colombia cerca de 20 millones de personas conforman la PEA, solamente 9 millones están cubiertos por la seguridad laboral y social, los otros 11 millones pertenecen al sector informal, trabajadores expuestos sin ningún tipo de control, capacitación, y educación a los riesgos propios de su actividad laboral (DANE, 2017). Conjuntamente, la Ley 879 del 2000, también llamada Ley de Flexibilización Laboral, permitió la intermediación de la contratación a través de cooperativas de trabajo, pero, en muchos casos, éstas desatienden las normas mínimas relativas a la seguridad social (Kalmanovitz S, 2010). Lo anterior permite evidenciar que el gobierno no ha generado un mayor interés por la prohibición y distribución de estos productos con altos niveles de solventes orgánicos; además no ha estado muy pendiente del cumplimiento de los derechos de los trabajadores que les permitan prevenir los efectos adversos producidos en su ambiente laboral. Por lo tanto, se evidencia la necesidad de la implementación de estudios de biomonitorio que permitan aumentar la capacidad para identificar riesgos tempranos en la salud e implementar programas de vigilancia epidemiológica ocupacional y así mejorar la calidad de vida de los trabajadores.

La OMS plantea que al menos un 30 % de los casos de cáncer podría evitarse si se reconocen y se controla el uso de los agentes causales de la enfermedad (carcinógenos) (OMS & OPS, 2017). El aumento de enfermedades carcinogénicas, ha generado un interés mundial por la aplicación de biomarcadores, con el fin de evaluar los efectos que produce la exposición ambiental y ocupacional a agentes tóxicos sobre el daño cromosómico en los tejidos epiteliales en las poblaciones humanas (Ceppi et al., 2010). De los tejidos epiteliales el mas utilizado en estudios de biomonitorio es el tejido epitelial de la mucosa bucal, ya que al ser la primera barrera de proteccion contra la exposicion a agentes toxicos ambientales, tambien permite identificar cambios en las celulas, con morfologias anormales a traves de tecnicas economicas, faciles y poco invasivas (Thomas and Fenech,2011). Uno de los principales interesados en aplicar estudios de biomonitorio en celulas bucales es el Proyecto de Colaboración Internacional sobre la Frecuencia de micronúcleos en tejidos epiteliales de poblaciones humanas (HUMNxl), el cual lleva a cabo un amplio estudio de colaboración internacional con el fin de validar el biomarcador de Micronúcleos en células bucales como predictor de riesgo a cáncer (Ceppi et al., 2010)

La relevancia de la presente investigación es unirse al esfuerzo internacional, generando un conocimiento científico que pueda contribuir a la validación de micronúcleos y otras anomalías nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal para que pueda ser utilizada como una herramienta de la epidemiología genética temprana para evaluar el daño genotóxico causado por la exposición ocupacional a solventes orgánicos; adicionalmente, el presente estudio pretende aumentar la capacidad de identificar riesgos tempranos en la salud para

implementar programas de vigilancia epidemiológica ocupacional y así mejorar la calidad de vida de los trabajadores especialmente en los talleres de pintura informales en el departamento del Cauca.

Hipótesis. La mezcla compleja de solventes orgánicos a la que están expuestos los pintores de vehículos automotores no inducen un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y brotes nucleares en el grupo expuesto con respecto al grupo no expuesto (H1), de lo contrario la mezcla compleja de solventes orgánicos induce un aumento significativo del daño genotóxico en el grupo expuesto comparado con el grupo control (H0).

3. MARCO TEORICO

3.1 Solventes orgánicos.

Son un grupo de compuestos hidrocarbonados relativamente volátiles que se usan comúnmente en la industria, por ejemplo en pinturas y fabricación de químicos o como petróleo y gasolina (Barbosa et al., 2015). El thinner y las pinturas utilizadas por los pintores de carros son mezclas complejas de solventes orgánicos que contienen: benceno, tolueno, isobutano, m-xileno, hexano, noveno, dimetilexano, etilbenceno, p-xileno, octano, o-xileno y otros compuestos con masas < 1% (Hoyos-Giraldo et al., 2009). Cuando el cuerpo humano entra en contacto con estos compuestos, la vía respiratoria es el medio más frecuente de absorción, sin embargo, también pueden entrar al cuerpo a través de los poros de la dermis, cuando entran en contacto directo con la piel (Sato & Nakajima 1987). Las propiedades físico-químicas de los solventes orgánicos les permite cruzar el epitelio del tracto aerodigestivo y alcanzar el interior de las células de la mucosa oral, que componen la primera barrera contra los agentes que entran al cuerpo por inhalación (Schenker & Jacobs, 1996; Thomas et al., 2009).

Las células del epitelio bucal tienen la capacidad de metabolizar xenobióticos y transformarlos a productos menos reactivos o más tóxicos, estos últimos tienen la capacidad de producir daños celulares y genéticos irremediables (Kashyap & Reddy, 2012; Spivack et al., 2004; Vondracek et al., 2001). Se sabe que el uso regular y la exposición a solventes orgánicos dan como resultado efectos tóxicos que conduce a efectos adversos en diferentes sistemas del cuerpo humano, incluidos los órganos sensoriales (Barbosa et al., 2015).

3.2 Especies reactivas de oxígeno y lesiones en el ADN.

Durante el metabolismo de los solventes orgánicos se generan intermediarios químicos y EROs como radicales superóxido, hidroxilo, peróxido, entre otros, los cuales inducen daño oxidativo y rupturas de cadena sencilla en el ADN (Moro et al., 2010; Lewis et al., 1988; Murata et al., 1999). Las EROs se forman de manera natural en la célula, sin embargo cuando los niveles de estas especies son mayores que la de las enzimas antioxidantes se produce estrés oxidativo, lo que induce lesiones en el material genético, como la formación de sitios abásicos, bases oxidadas o rupturas de cadena sencilla o doble (Belitsky & Yakubovskaya 2008).

3.3 La mucosa bucal.

Está conformada por dos tejidos uno epitelial y otro conectivo, el tejido epitelial se encuentra en contacto con el exterior y presenta cuatro capas diferentes: (1) la más externa es la córnea, está constituida por células queratinizadas diferenciadas que se pierden constantemente producto del desgaste, (2) debajo de la capa queratinizada, se encuentra el extracto granuloso, sus células diferenciadas tiene gránulos de queratohialina para la producción de queratina, (3)

la capa espinosa se encuentra por debajo de la capa queratinizada, aquí se encuentran células diferenciadas necróticas o apoptóticas y (4) la capa basal es la más interna, se encuentran las células que están en constantemente dividiéndose y migrando hasta el extracto más externo durante un periodo de 7 a 21 días, este es el lugar donde el daño genético que no es reparado o está mal reparado puede ser expresado como micronúcleos o brotes nucleares (Holland et al. 2008).

3.4 Biomonitorio humano.

Es una herramienta que permite medir la exposición directa de los seres humanos a contaminantes del medio ambiente a través de la medición de sustancias o sus metabolitos en sangre, orina u otras muestras biológicas (CDC, 2008). Una de las principales utilidades es identificar las relaciones entre exposición química y enfermedades o anomalías en desarrollo, permitiendo prevenir o reducir los efectos producidos por los químicos (Jensen et al. 2005).

3.5 Biomarcadores.

Son cambios generalmente tempranos, medibles a nivel estructural, morfológico, bioquímico o fisiológico, producidos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos (Bonassi & Au 2002). Son considerados, eventos que se producen en un sistema biológico y se interpreta como indicador del estado de salud, de la esperanza de vida o del riesgo de una enfermedad (Manno et al., 2010) y juegan un papel básico en la detección temprana de riesgo en la salud de las poblaciones expuestas (Bartolotta et al. 2011). Los biomarcadores han sido clasificados según su significancia toxicológica como: de exposición, de efecto y de susceptibilidad (Manno et al., 2010).

3.5.1 Biomarcadores de exposición.

Son compuestos químicos o metabolitos que resultan de la interacción entre químicos y macromoléculas, que son medibles ya sean órganos, compartimientos o fluidos de un organismo (Manno et al., 2010). Este tipo de biomarcadores permiten detectar si un individuo ha estado expuesto a un xenobiótico o agente tóxico, y adicionalmente permite la cuantificación de la absorción estableciendo la presencia del tóxico o algunos de sus metabolitos en muestras biológicas (Gil-Hernández, 2000).

3.5.2 Biomarcadores de susceptibilidad. Son marcadores que permiten evaluar la sensibilidad individual a daños en el ADN provocado por agentes endógenos o exógenos (Manno et al., 2010). Dentro de este grupo se encuentran el polimorfismo de enzimas (Anderson et al., 2006), polimorfismo de la glutatión-transferasa (Norppa 2004) y polimorfismo genético (Knudsen et al. 2001).

3.5.3 Biomarcadores de efecto. Son marcadores medibles que se generan producto de reacciones metabólicas internas y que se relacionan directamente con un estado de exposición ambiental. Entre los cambios o respuestas medibles están la formación de aductos en el ADN, alteraciones en actividades enzimáticas,

o daños en el material genético de la célula que pueden expresarse como micronúcleos o brotes nucleares. Actualmente, son ampliamente usados en biomonitoreos de poblaciones expuestas ocupacional o ambientalmente para la evaluación de los efectos tempranos y la identificación de grupos con alto riesgo a desarrollar cáncer (Gil- Hernández, 2000).

3.5.3.1 Brotes nucleares. Son cuerpos extracelulares que tienen un diámetro que corresponde a la tercera o dieciseisava de la parte del núcleo principal, se forman por procesos de eliminación del exceso de material nuclear, proteínas de reparación del ADN o ADN amplificado, su principal característica es que está conectado al núcleo principal por un puente nucleoplasmático (Bolognesi et al., 2013).

3.5.3.2.1 Puentes nucleoplásmicos. Son cuerpos extracelulares con un diámetro mayor a la tercera parte de núcleo, unidos al núcleo principal por un fino puente nucleoplasmático (Bolognesi et al., 2013). Se forman a partir de rupturas de cadena doble, reparadas por extremos no homólogos (NHEJ) o partir de cromosomas dicéntricos (Fenech et al., 2011).

3.6 Micronúcleos y significancia biológica.

Son pequeños cuerpos extra nucleares que tienen un diámetro que corresponde a una tercera o dieciseisava parte del núcleo principal. Se originan a partir de un cromosoma entero rezagado por deficiencias en el huso mitótico o un fragmento acéntrico producto de la ruptura cromosómica como resultado de lesiones primarias en el ADN (Fenech 1993). El ensayo de micronúcleos es uno de los biomarcadores citogenéticos más utilizados en estudios de biomonitoreo para evaluar el daño clastogénico y/o aneugénico de poblaciones expuestas ambiental u ocupacionalmente a factores ambientales (Battershill et al., 2008). La significancia biológica de este biomarcador de micronúcleos radica en que su expresión, es indicador de daños estructurales y alteraciones numéricas de los cromosomas, que pueden ser el reflejo de una inestabilidad cromosómica, evento típicamente en las células cancerosas (Bonassi et al., 2007). En los últimos años se ha presentado un aumento en el uso del ensayo de micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal, debido a que son un método mínimamente invasivo que permite evaluar los daños causados por la exposición a xenobióticos, por lo tanto las células del epitelio bucal podrían ser consideradas como células centinelas de eventos genotóxicos, de inestabilidad genética y carcinogénicos (Fenech et al., 1999; Holland et al., 2008).

3.6.1 Ensayo de micronúcleos como predictor de riesgo a cáncer. El ensayo de micronúcleos en células del epitelio bucal aún no ha sido validado como predictor de riesgo a Cáncer, sin embargo, en estos últimos años se ha observado un creciente interés mundial por la validación de este biomarcador. Los laboratorios y las publicaciones dedicadas al estudio de micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal desde los años 90 han ido en aumento, debido a que

este biomarcador tiene unas ventajas sobre el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, al ser una técnica sencilla, económica y lo más importante menos invasiva. El objetivo de HUMNxl es validar los micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal, explorando las fuentes de variabilidad en el ensayo (entre laboratorios y registradores de anomalías, así como las diferencias inter e intraindividuales en los sujetos), además resolver cuestiones técnicas, como el método de tinción de las células bucales, criterios óptimos para el registro de micronúcleos y otras anomalías para poder validarlo como un biomarcador predictivo (Holland et al., 2008).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el estado genotóxico en células exfoliadas del epitelio bucal en una población ocupacionalmente expuesta a una mezcla de solventes orgánicos.

4.2 Objetivos específicos

Establecer la frecuencia de micronúcleos y brotes nucleares en una población expuesta a solventes orgánicos y una población no expuesta.

Determinar la relación entre la frecuencia de los biomarcadores genotóxicos y variables como la edad y años exposición.

5. ANTECEDENTES

Hasta el momento son pocos los estudios que evalúen el daño genotóxico en células exfoliadas del epitelio bucal utilizando biomarcadores de genotoxicidad en pintores expuestos a solventes orgánicos. Estudios realizados en países como Turquía, Cuba, Brasil y México, reportaron un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos en pintores expuestos a solventes orgánicos con relación a un grupo no expuesto (Çelik et al., 2010; Diaz et al., 1990; Martino-Roth et al., 2002; Pinto et al., 2000). Resultados contrarios fueron publicados por Moro et al., (2012) y Cassini et al., (2011). Cabe resaltar que el estudio de Çelik et al., (2010), también encontró diferencias significativas entre grupos para brotes nucleares.

Especialmente en el departamento del Cauca se llevaron a cabo dos estudios en pintores expuestos a solventes orgánicos utilizando biomarcadores de genotoxicidad (datos no publicados). Arenas & Ortega, (2011), encontraron un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos del grupo expuesto con relación al no expuesto, mientras que Ortega E, (2013), reportó resultados contrarios para micronúcleos, según el argumento este resultado se dio debido a que el tamaño poblacional que utilizó no fue lo suficientemente grande para evidenciar diferencias significativas entre los grupos, por otro lado este mismo autor encontró diferencia significativa entre grupos en la frecuencia de brotes nucleares entre los grupos evaluados.

El estado genotóxico producido por la exposición ocupacional a solventes orgánicos también ha sido evaluado en sangre periférica utilizando el biomarcador de micronúcleos y el ensayo cometa. Las investigaciones realizadas con estas técnicas citogenéticas encontraron aumentos significativos de daño genético en personas expuestas a solventes orgánicos en comparación a un grupo de individuos no expuestos (Testa et al., 2005; Torres et al., 2008; Fisiol, 2014). En el departamento del Cauca se realizó un estudio de biomonitorio biológico utilizando el ensayo de alteraciones cromosómica, se reportó un aumento significativo de la frecuencia de alteraciones cromosómicas de tipo cromatídico en la población expuesta (Hoyos-Giraldo et al., 2009). No obstante, el estudio de Cardenas-Bustamante et al., (2007), utilizando el ensayo cometa no encontraron un aumento significativo de daño genotóxico entre grupos. Hasta ahora los resultados son contradictorios y se recomienda seguir investigando el impacto de la exposición a solventes orgánicos a través de biomarcadores sensibles de daño al ADN.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 Tipo de estudio

La presente investigación es un estudio tipo epidemiológico de corte trasversal, en una población ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos, a quienes se les realizó un monitoreo genético empleando los biomarcadores de micronúcleos y brotes nucleares.

6.2 Población objeto de estudio

La población objeto de estudio estuvo conformada por un grupo de pintores de carros aparentemente sanos, ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos de talleres de pintura automotriz encontrados en diferentes municipios departamento del Cauca (Figura 1). El grupo control estuvo conformado por personas del departamento del Cauca, sanas y no expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos.

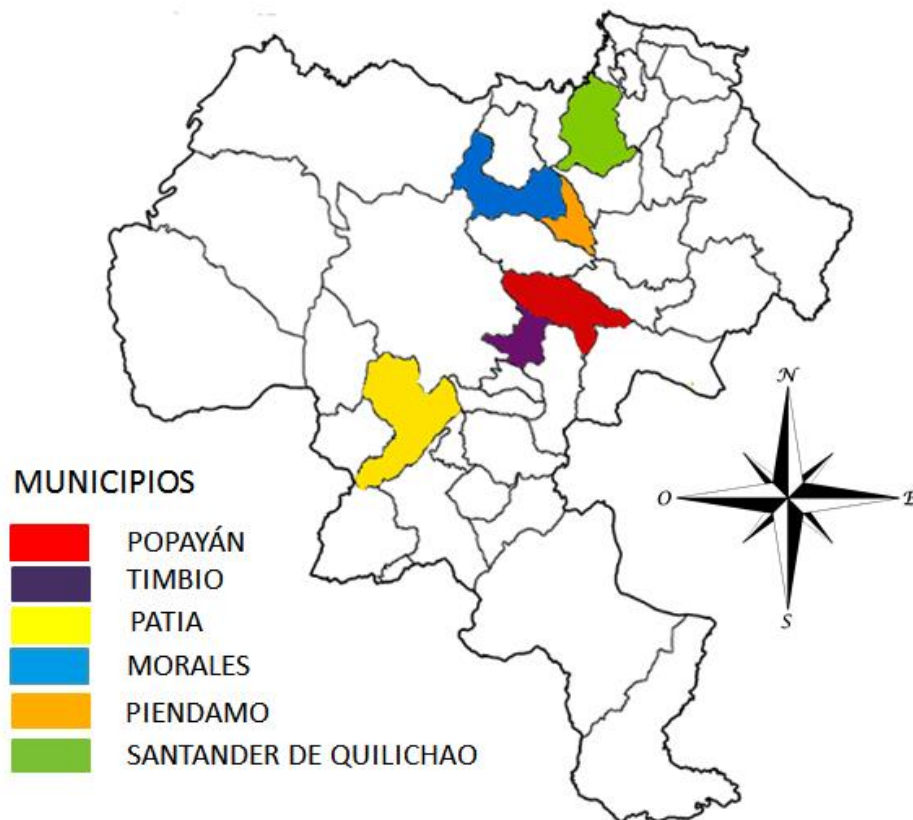


Figura 1. Municipios del departamento del Cauca donde se obtuvo la población de estudio

6.3 Selección de la población

Primero se buscó la población expuesta a solventes orgánicos, una vez identificada se les informó a la población los objetivos, metodologías, ventajas y riesgos, de participar en el estudio, a los que aceptaron participar voluntariamente en este estudio se procedió a hacerles firmar un consentimiento informado y a realizarles una encuesta con el fin de coleccionar información acerca de la edad, estilo de vida, estado de salud, historial ocupacional entre otros. Los individuos del grupo no expuesto, se seleccionaron teniendo en cuenta un rango de edad similar al del grupo expuesto, con una desviación de más o menos dos años (± 2) de edad, para evitar una desigualdad de los promedios edad (Albertini et al., 2000).

6.3.1 Criterios de inclusión y exclusión. Se incluyeron hombres sanos entre los 18 y 55 años, pintores de carros con una exposición ≥ 5 años. En ambos grupos, se excluyeron personas fumadoras, sometidas a irradiación en los últimos tres meses, consumidoras de drogas psicoactivas, con enfermedades hereditarias o cáncer, hospitalizadas y que consumieran medicamentos.

6.4 Tamaño de la muestra

El monitoreo genético se realizó en 120 personas, 60 personas conformaron el grupo ocupacionalmente expuesto a solventes orgánicos y 60 personas conformaron el grupo no expuesto, muy cercano al número poblacional planteado por Ceppi et al., (2010), quienes propusieron que para haya un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en el grupo expuesto, se debía trabajar con 130 individuos (65 expuestos y 65 no expuestos).

6.5 Prueba de micronúcleos

Las muestras de las células del epitelio bucal fueron tomadas de las dos mejillas de cada participante, realizando un suave masaje con un cepillo citológico nuevo y estéril, luego las células se pasaron a un tubo falcón con 5ml de solución salina y se refrigeraron. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del grupo de Toxicología, Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca de acuerdo con el protocolo de Thomas et al., (2009) y con pequeñas modificaciones. Brevemente, las muestras se sometieron a tres lavados con el fin de retirar cualquier residuo del epitelio bucal. Las células se procesaron mediante centrifugación y aspiración del sobrenadante, seguido de la adición de metanol (80%) y DMSO y posteriormente fueron sometidas a una dispersión celular a través de un proceso de resuspensión por 5 minutos, este mismo proceso se repitió dos veces, pero se cambió el metanol por solución salina. Por último, al botón celular se le agrego metanol frio al 80%. El extendido celular se realizó en una placa previamente limpia, a la que se adiciono 3 gotas de suspensión celular que se dejaron secar por un día, luego se pasó a fijar con metanol al 80% por 20 minutos.

Finalmente cuando las placas secaron, se pasó a realizar una tinción específica para ADN (feulgen fast Green), con el fin de evitar falsos-positivos, que frecuentemente son registrados como micronúcleos (Thomas et al. 2009), primero

se hidrataron las células usando etanol al 50% y al 20%, luego se pasó a realizar un proceso de desnaturalización del ADN con HCL 5M, este fue el paso más crítico e importante, debido que en él se dio una hidrólisis ácida capaz de liberar bases púricas, que dieron lugar a la formación de grupos aldehídos, que fueron reconocidos y teñidos por el reactivo schiff, generando núcleos con un contraste magenta o fucsia. Adicionalmente, se empleó light Green para colorear el citoplasma.

6.5.1 Registro de micronúcleos y brotes nucleares. Estos biomarcadores fueron registrados en 2000 células epiteliales normales diferenciadas con un microscopio óptico a 100x. La frecuencia se reportó en 1000 células. El registro de las células del epitelio bucal se realizó según los criterios propuestos por Tolbert et al., (1992).

6.6 Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron a partir de una encuesta individual y los registros de las anomalías nucleares fueron sistematizados en Microsoft Excel y posteriormente se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 19 (Statistical Package for the Social Scienses). Para probar la normalidad de los datos se sometieron a la prueba de Kolmorov Smirnov. La comparación de la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad entre grupos, se realizó mediante la prueba U-mann whitney. El análisis de la correlación entre la edad y el tiempo de exposición con los biomarcadores de genotoxicidad, se efectuó mediante la prueba de correlación de spearman. La significancia usada fue $\alpha \leq 0.05$ como criterio para rechazar la hipótesis nula (H_0), con un intervalo del 95% de confianza.

7. RESULTADOS

Tabla1. Características y frecuencia media de los biomarcadores de genotoxicidad.

Variables	Grupo de estudio		<i>p</i> - valor
	Referente	Expuesto	
Edad (años)	42,03±10,06	42,65 ± 9,37	0,729
Tiempo de exposición (años)	-	20,08 ± 9,88	
Frecuencia de micronúcleos / 1000 células	0,02± 0,01	0,16 ± 0,04	<0,001 ^a
Frecuencia de brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos/ 1000 células	0,18± 0,04	0,75 ± 0,09	<0,001 ^a

Los datos se muestran media ± desviación estándar / error estándar según corresponda

^aPrueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$)

No se encontraron diferencias significativas en distintos aspectos de la población como condiciones de salud, consumo de cigarrillo, alcohol y medicamentos entre personas expuestas y referentes (datos no mostrados). La edad media del grupo no expuesto fue 42,03±10,07 años y la del grupo expuesto fue 42,65± 9,37 años, por otro lado, la media del tiempo de exposición fue 20,08±9,89 años (Tabla 1). Se evidenció que la exposición ocupacional a solventes orgánicos influyó significativamente en el aumento de la frecuencia de micronúcleos de la población expuesta en relación a la población no expuesta ($p=0,001$), de igual forma se incrementó la frecuencia de brotes nucleares ($p<0,001$).

Tabla2. Valores de asociación y significancia.

Biomarcadores	Edad		Años exposición	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Micronúcleos	0,094	0,476	0,143	0,277
Brotos nucleares	0,029	0,828	0,100	0,446

Las pruebas de correlación realizadas mostraron que la edad no se asoció con la frecuencia de micronúcleos ($r= 0,094$, $p=0,476$), ni con la frecuencia de brotes nucleares ($r= 0,029$, $p =0,828$). De igual forma el tiempo de exposición no se asoció con la frecuencia de ninguno de los biomarcadores analizados.

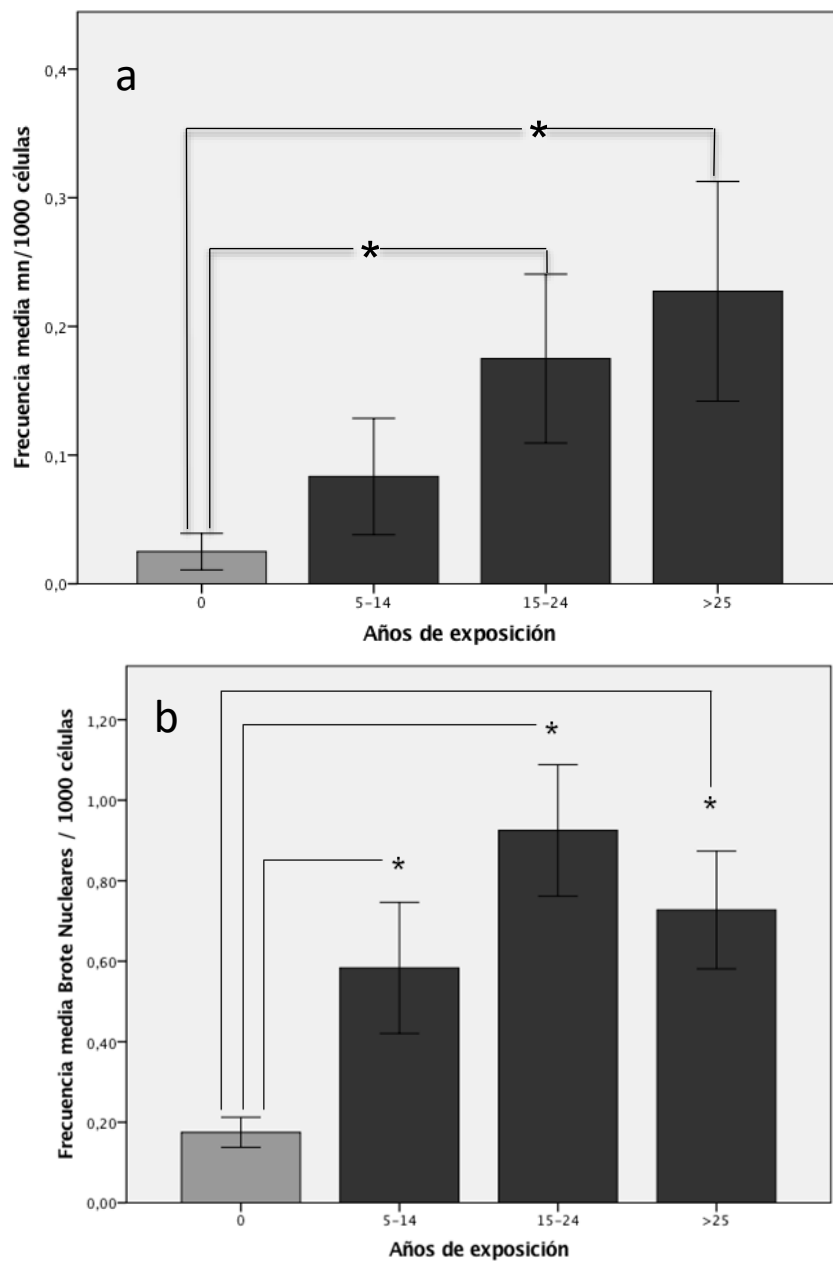


Figura 2. Relación entre el tiempo de exposición y: a) micronúcleos b) brotes nucleares. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. El asterisco indica una correlación estadísticamente significativa $p < 0.05$

Tabla3. Riesgo de aparición de micronúcleos

Variable	OR	Intervalo de confianza	Valor p
Años de exposición			
0	1,00		
5 – 14	3,80	0,69 – 20,77	0,123
15 – 24	8,14	1,81 – 36,65	0,006
Más de 25	8,87	2,04 – 38,45	0,004

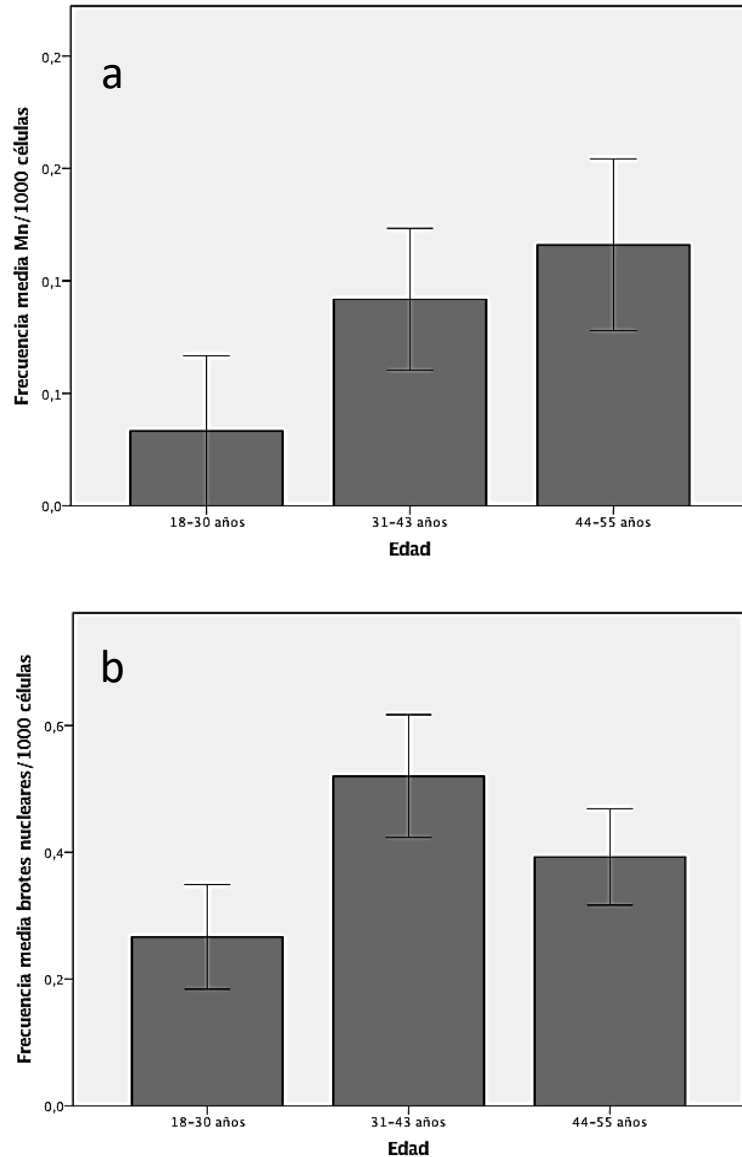


Figura 3. Relación entre la edad y a) micronúcleos b) brotes nucleares. Las barras de error representan la desviación estándar de la media

Las pruebas de comparación entre grupos indicaron aumento significativo entre las categorías del tiempo de exposición, a partir de 15 años para micronúcleos y desde los 5 años de exposición para brotes nucleares. Mientras que para la edad no se evidenciaron diferencias significativas entre sus categorías, pero si una tendencia al aumento en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad a medida que el tiempo de exposición y edad era mayor. Los individuos del grupo expuesto con 15 – 24 años de exposición tienen un riesgo de 8,14 veces y los que tienen más de 25 años de exposición tienen un riesgo de 8,87 veces de aparición de micronúcleos en comparación con los individuos del grupo control (No expuestos) y como puedes observar estos datos estadísticamente significativos

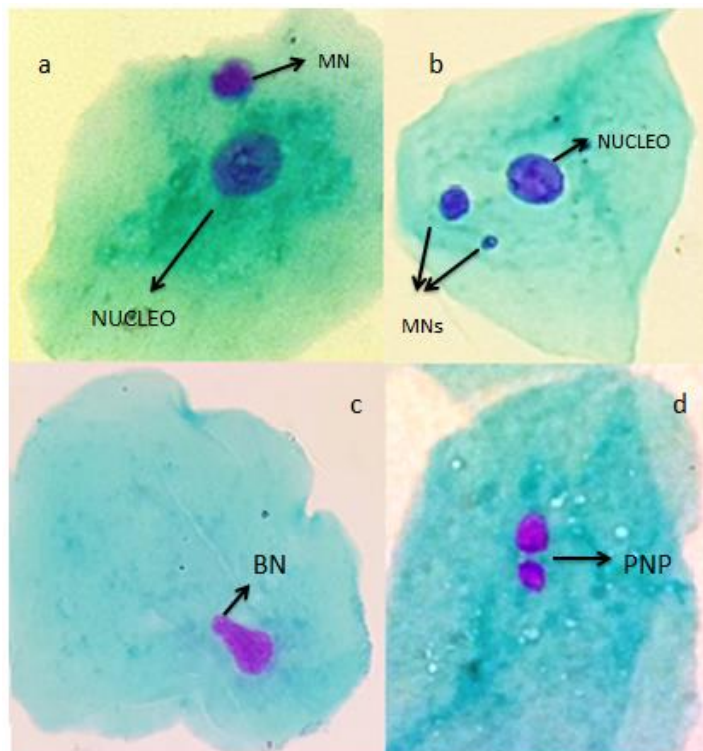


Figura 4. Fotografías de células exfoliadas del epitelio bucal, teñidas con Feulgen Fast Green y magnificadas con un lente de 100x de un microscopio de luz, a-b) células con micronúcleos MN c) brotes nuclear BN d) puente nucleoplasmico PNP.

8. DISCUSIÓN

La exposición ocupacional a solventes orgánicos causa un efecto genotóxico, evidenciado a través de una alta frecuencia en los biomarcadores de genotoxicidad. Este resultado se puede atribuir propiedades sinérgicas de las mezclas complejas de solventes orgánicos a las que frecuentemente están expuestos los pintores de vehículos automotrices, estas características tienen la capacidad de potencian la aparición de efectos clastogénicos, los cuales son responsables de la inducción de daños al material genético que no solo incluyen al ADN, sino también a componentes celulares relacionados con la funcionalidad y movimiento de los cromosomas dentro de la célula, estos daños nucleares pueden expresarse como micronúcleos y brotes nucleares (Porciello et al. 2003; Hoyos-Giraldo et al. 2009).

Los resultados de este estudio para micronúcleos coinciden con los reportados por otros autores en diferentes países (Çelik et al., 2010; Diaz et al., 1990; Martino-Roth et al., 2002; Pinto et al., 2000), quienes evaluaron el efecto de los solventes orgánicos en pintores, utilizando el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal. Asimismo, el aumento significativo de la frecuencia de brotes nucleares en la población expuesta, coincide con resultados obtenidos por Çelik et al., (2010). Es importante resaltar dos estudios realizados en el departamento del Cauca, que evaluaron el efecto genotóxico de las células del epitelio bucal en los pintores de vehículos automotrices (datos no publicados). Estas investigaciones manejaron diseños metodológicos y criterios de inclusion similares a las utilizados en este estudio. Arenas & Ortega, (2011), encontraron resultados similares a los hallados en este estudio para micronucleos, sin embargo el estudio de Ortega E, (2013), reportó resultados contrarios, según el argumento este resultado fue debido al tamaño de población (n=100) menor al propuesto en otros estudios (Ceppi et al. 2010). La frecuencia basal de los micronúcleos encontrada en la presente investigación fue menor a la reportada por un estudio de meta-análisis realizado por Bonnassi et al. (2011). Lo cual se explica por una amplia variedad de factores (colecta, procesamiento y tinción de muestras biológicas) que pueden influir al momento de registro de micronúcleos en los grupos de estudio (Ceppi et al. 2010; Thomas et al. 2009). El estudio de Ortega E, (2013), también evaluó el biomarcador de brotes nucleares, encontrando resultados similares a los hallados en este estudio, sin embargo, las frecuencias basales de estas dos investigaciones fueron menores a las encontradas por Çelik et al., (2010), posiblemente debido a variaciones en el diseño metodológico y que además incluyeron fumadores.

A pesar de que no encontramos una relación directa entre los biomarcadores evaluados con los años de exposición, decidimos categorizar esta variable encontrando que a partir de los 15 años de exposición los individuos presentan un riesgo incrementado de aparición de micronúcleos en comparación con los

individuos no expuestos. La exposición ocupacional crónica a compuestos químicos con alto contenido de agentes mutágenos, clastógenos, carcinógenos y teratógenos como los solventes orgánicos, puede producir daños en los sistemas de reparación del ADN y conllevar a la aparición de anomalías nucleares que incrementan a directamente con los años de exposición (Bonassi et al. 2000).

Por otro lado, en este estudio no se encontró una asociación significativa entre la edad y la frecuencia de los biomarcadores evaluados. Este resultado es similar a lo reportado por Martino-Roth et al., (2002); Arenas & Ortega, (2011), para micronúcleos y Ortega E, (2013), para micronúcleos y brotes nucleares. A pesar de que no hubo una relación positiva entre la edad de los individuos y los biomarcadores, pudimos observar una tendencia al aumento de la frecuencia de micronúcleos y brotes nucleares en individuos de edad avanzada. Según Thomas et al. (2009), la edad es factor de confusión que puede influir en el aumento de la frecuencia de anomalías nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal, debido a que la capacidad de reparar los daños del ADN disminuye con la edad. Este hecho se produce porque a medida que aumenta la edad se produce desequilibrio en la producción de las enzimas responsables de la reparación del ADN, llevando a la célula a no reparar los daños producidos o a tomar métodos de reparación menos efectivos (Gorbunova et al. 2007; Orta & Günebakan 2012; Ferraz et al 2009).

Una de las explicaciones frente a la baja asociación entre los biomarcadores de genotoxicidad con la edad y el tiempo de exposición posiblemente se puede deber a la biología del tejido epitelial evaluado, especialmente al tiempo de regeneración de células y momento de colección de las mismas. Por un lado, las células exfoliadas del epitelio bucal se regeneran cada 21 días lo cual puede influir al momento de coleccionar las células, esto además evita que se acumulen daños a través del tiempo como si sucede en los linfocitos de sangre periférica (Holland et al. 2008). Adicionalmente, estudios previos han proporcionado información que explica que la no identificación de la frecuencia de polimorfismos genéticos como glutatión S-transferasa T1 y M1, han limitado explicar como las diferencias individuales pueden influir en el aumento de biomarcadores de genotoxicidad (Hoyos-Giraldo et al. 2009; Kim et al. 2004).

La revisión bibliográfica realizada evidenció que hay diversos factores de confusión que podrían afectar la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad, por esta razón es importante para futuros estudios de biomonitorio tener en cuenta el; 1) uso continuo de protocolos internacionales para la colecta, procesamiento, tinción e identificación de anomalías nucleares 2) manejo de números de muestra mayores a los propuestos por Ceppi et al., (2010), que permitan no solo encontrar diferencia significativa entre grupos, si no hallar una posible asociación entre los biomarcadores de genotoxicidad con la edad o el tiempo de exposición y 3) exclusión de personas fumadoras, sometidas a irradiación en los últimos tres meses, consumidoras de drogas psicoactivas, con

enfermedades hereditarias o cáncer, hospitalizadas y que consuman medicamentos, con el fin de evaluar el efecto de los solventes orgánicos, sin factores de confusión que afecten sus resultados.

Finalmente, uno de los propósitos de esta investigación fue brindar a la población de estudio información que les permitiera tener una nueva perspectiva sobre los riesgos que conlleva la exposición ocupacional a solventes orgánicos, para ello se realizó la socialización de los resultados obtenidos. Algo importante para resaltar de esta socialización es que en el momento de exponer los resultados, fue posible captar el interés de la población puesto que existían vacíos sobre los efectos adversos a corto y largo plazo que producen su ocupación. Por esta razón, se brindó explicaciones sobre: principales enfermedades relacionadas, importancia y finalidad de los biomarcadores utilizados, medidas de protección necesarias y la alimentación adecuada para ayudar a contrarrestar los efectos de la exposición y prevenir enfermedades agudas y crónicas.

9. CONCLUSIONES

La exposición ocupacional crónica a solventes orgánicos en los pintores de automotores aumenta significativamente la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad en el epitelio bucal, evidenciando el papel clastogénico de la mezcla compleja de los químicos utilizados.

El tiempo de exposición a solventes orgánicos, sólo a partir de los 15 años, incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos en los pintores de carros.

El incremento en la edad de los participantes no afectó directamente la frecuencia de los biomarcadores, a pesar de que se pudo observar frecuencias más altas de los biomarcadores evaluados en los individuos de edad avanzada, pero de manera no significativa.

REFERENCIAS

- Albertini, R.J. et al., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 463(2), pp.111–172.
- Anderson, J.E. et al., 2006. Methods and biomarkers for the diagnosis and prognosis of cancer and other diseases: Towards personalized medicine. *Drug Resistance Updates*, 9(4–5), pp.198–210.
- Bartolotta, S.A. et al., 2011. Micronuclei assay in exfoliated buccal cells from individuals exposed to arsenic in Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(2), pp.337–343.
- Battershill, J.M., Burnett, K. & Bull, S., 2008. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: Impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 23(6), pp.423–437.
- Belitsky, G. A., & Yakubovskaya, M. G. (2008). Genetic Polymorphism and Variability of Chemical Carcinogenesis, 73(5).
- Bolognesi, C. et al., 2013. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - An update and expanded photogallery. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 753(2), pp.100–113.
- Bonassi, S. et al., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. , 28(3), pp.625–631
- Bonassi, S. et al., 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60(6), pp.1619–1625.
- Bonassi, S., Neri, M., & Puntoni, R. (2001). Validation of biomarkers as early predictors of disease, 481(September 2000), 349–358.
- Bonassi, S. et al., 2011. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 728(3), pp.88–97.
- Cardenas-Bustamante, O., Varona-Uribe, M., Patiño-Flórez, R., Groot- Restrepo, H., Sicard-Suarez, D., Torres-Carvajal, M., and Pardo, D. (2007). Bogotá paint-industry workers' exposure to organic solvents and genotoxic effects. . *Revista de Salud Pública* 9,275-288.

Cassini, C, Calloni, C., bortolini,G., Garcia, S.C., Dornelles,M.A., Henriques, J.A.P., Erdtmann, B., and Salvador, M (2011).Occupational risk assessment of Oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. *Interntional journal of occupational medicine and environmental health* 24,308-319.

CCS. (2015). *En Colombia se desconoce la magnitud y la importancia del cáncer como enfermedad laboral*. Recuperado el 12 de 11 de 2017, de http://ccs.org.co/salaprensa/index.php?option=com_content&view=article&id=515:cancer&catid=296&Itemid=830

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). National Biomonitoring Program; 2008.

Çelik, A., Çavaş, T. & Ergene-Gözükara, S., 2003. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: Micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*, 18(5), pp.417–421.

Celik, A., Diler, S. B., & Eke, D. (2010). Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA and cell biology*, 29(6), 277-284.

César G. Lizarazoa, J. M., fajardo, j., berrio, s., & Quintanaa, L. (2010). *BREVE HISTORIA DE LA SALUD OCUPACIONAL EN COLOMBIA*. Recuperado el 21 de 10 de 2017, de Departamento de Ingeniería Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.: http://www.oiss.org/estrategia/IMG/pdf/Breve_historia_sobre_la_salud_ocupacional_en_Colombia1.pdf

CESVI COLOMBIA. (14 de 3 de 2017). *Colombia necesita una legislación específica para los compuestos orgánicos volátiles de los talleres de pintura*. Recuperado el 21 de 10 de 2017, de autocrash: <http://www.revistaautocrash.com/colombia-necesita-una-legislacion-especifica-los-compuestos-organicos-volatiles-los-talleres-pintura/>

Ceppi, M. et al., 2010. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 705(1), pp.11–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.11.001>.

Consejo Colombiano de Seguridad. (2014). *La seguridad y Salud en el Trabajo en cifras*. Recuperado el 3 de 11 de 2017, de http://ccs.org.co/salaprensa/index.php?option=com_content&view=article&id=573:sst&catid=320&Itemid=856

Costa C, Pasquale RD, Silvari V, Barbaro M, Catania S. In Vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol in Vitro*. 2006; 20:324-331.

DANE. (2016). Recuperado el 3 de 11 de 2017, de <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/educacion/fuerza-laboral-y-educacion>

DANE. (10 de 10 de 2017). *En el trimestre móvil junio - agosto de 2017 el porcentaje de ocupados que cotizan a pensión fue 50,4% en las 13 ciudades y 49,1% en las 23 ciudades con sus respectivas áreas metropolitanas*. Recuperado el 3 de 11 de 2017, de http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/ech/ech/comunicados_de_prensa/Cp_GEIH_jun17_ago17.pdf

Diaz, S., Fonseca, G., & Fernandez, I. (1990). Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers, *0*, 0–3.

EPA. (2001). *Hazardous Waste Management System; Identification and Listing of Hazardous Waste; Paint Production Wastes; Land Disposal Restrictions for Newly Identified Wastes; CERCLA Hazardous Substance Designation and Reportable Quantities; Designation of n-Butyl Alc*. Recuperado el 2 de 11 de 2017, de <https://translate.google.com.co/translate?hl=es&sl=en&tl=es&u=https%3A%2F%2Fwww.federalregister.gov%2Fdocuments%2F2001%2F02%2F13%2F01-3087%2Fhazardous-waste-management-system-identification-and-listing-of-hazardous-waste-paint-production>

Diaz, s., Fonsec, G., and Fernandez, I. (1990). Analysis of lymphocytes and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. *hereditas* *113*,77-80.

.Fenech, M., Holland. N., CHANG, W., 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*, 271-283.

Fenech, M. et al., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, *26*(1), pp.125–132.

Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, *101*(SUPPL. 3), pp.101–107.

Ferraz, G. A., Neto, C., de Oliveira, A., Cerqueira, E. D. M. M., & Meireles, J. R. C. (2016). Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, *19*(4), 627-634.

Fisiol, C. (2014). Efecto genotóxico de la exposición a solventes orgánicos en trabajadores expuestos a pinturas de carros en bogotá, 2013.

Porciello, G. et al., 2003. Chromosome aberrations, valued as frequency of spontaneous micronuclei, in subjects with suspected presclerodermic Raynaud's phenomenon. *Reumatismo*, *55*(1), pp.28–33. Available at:

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=36378293>.

Gil-Hernandez, F. (2000). El papel de los biomarcadores en toxicología humana. In *Revista de Toxicología* (Facultad de Medicina de la univercidad de granada. Departamento de medicina Legal y Toxicologica), pp. 19-26.

Gorbunova, Vera, et al. "Changes in DNA repair during aging." *Nucleic acids research* 35.22 (2007): 7466-7474.

Holland, N. et al., 2008. Mutation Research / Reviews in Mutation Research The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage : The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. , 659, pp.93–108.

Hoyos-Giraldo, L.S. et al., 2009. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 666(1–2), pp.8–15.

International Register of Potentially Toxic Chemicals. Xylene. Scientific Reviews of Soviet Literature on Toxicity and Hazards of Chemicals. IRPTC (52). United Nations Environmental Programme; Moscú; 1984

Jensen, T.K. et al., 2005. Effects of breast feeding on neuropsychological development in a community with methylmercury exposure from seafood. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 15(5), pp.423–430.

Kalmanovitz S, editor. Nueva Historia Económica de Colombia. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá: Aguilar, Altea, Taurus, Alfaguara, S.A; 2010.

Kashyap, B., & Reddy, P. S. (2012). Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *Journal of cancer research and therapeutics*, 8(2), 184.

Kim, S.Y. et al., 2004. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene. *Pharmacogenetics*, 14(7), pp.453–463. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008571-200407000-00008>.

Knudsen, L.E., Loft, S.H. & Autrup, H., 2001. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1), pp.83–88

Lewis, J.G., Stewart, W. & Adams, D.O., 1988. Role of Oxygen Radicals in Induction of DNA Damage by Metabolites of Benzene¹. *Cancer Research*, 48, pp.4762–4765.

Lizarazo, C., Fajardo, J., Berrio, S., & Quintana, L. (2010). Breve Historia de la Salud Ocupacional en Colombia. Bogotá: OISS.

Manno, M. et al., 2010. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192(1), pp.3–16.

Martino-Roth, M.G. et al., 2002. Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4), pp.495–500.

Mattia C, Lebel C, Bondy S. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42:879-882.

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (18 de 9 de 2013). *ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible*. Recuperado el 21 de 10 de 2017, de incontec: http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/Otros/NTC/2013/NTC_6018_2013.pdf

Moro, A.M. et al., 2010. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Science of the total environment*, 408(20), 4461-4467.

Moro, A.M. et al., 2012. Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746(1), pp.42–48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.02.007>.

Murata, M., Tsujikawa, M. & Kawanishi, S., 1999. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*, 261(2), pp.478–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425210>

Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149(1–3), pp.309–334.

Palma, M. et al., 2015. Evaluación de la exposición a solventes orgánicos en pintores de carros de la ciudad de Bogotá. , 35, pp.66–76.

Peña, C., Carter, D., and Ayala-Fierro, F. (2001). Toxicología Ambiental. Southwest Hazardous Waste Program.

Pinto, D. et al., 2000. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), pp.105–111.

- Piyathilake, C.J. et al., 1995. Cigarette Smoking , Micronuclei Intracellular in Epithelial Vitamin Cells of the Buccal and Occurrence Mucosa ' of. , pp.751–758.
- Primera Encuesta Nacional de Condiciones de Salud y Trabajo en el Sistema General de Riesgos Profesionales. Bogotá: Ministerio de la Protección Social. Bogotá; 2007.
- Restrepo, J.A., “Un análisis de algunas definiciones de estas sustancias: Compuestos orgánicos volátiles (COVs)”. Vol. 12, No. 6, nov./dic. de 2007, págs. 24-26
- Rosin, M.P (1992). The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 267, 265-276.
- Ross,D (2000). The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 61, 357-372.
- Schenker,M., And Jacobs, J. (1995). The base excision repair pathway. *Trends n biochemical sciences* 20,391-397.
- Sato, A. & Nakajima, T., 1987. Pharmacokinetics of organic solvent vapors in relation to their toxicity. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 13(2), pp.81–93.
- Sc, A.J.S.H.B., 2004. Evaluation of DNA damage and DNA repair by the comet assay in workers exposed to organic solvents.
- Snyder R, Andrews L. Toxic Effects of Solvents and Vapors. En: Klassen C. Cassarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 5a ed. Editorial McGraw-Hill. 1996. New York. pp. 737-772
- Spivack, S.D. et al., 2004. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Research*, 64(18), pp.6805–6813.
- .Swanepoel AJ. Evaluation of DNA damage and DNA repair by the comet assay in workers exposed to organic solvents. Thesis (M.Sc. (Occupational Hygiene))-North-West University, Potchefstroom Campus, 2004. En: <http://hdl.handle.net/10394/1482>.
- Tafur,F(2007).informe de enfermedad profesional en Colombia 2003-2005. Ministerio de la protección social Dirección de Riesgos Profesionales.
- Testa, A. et al., 2005. A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46(3), pp.182–188.

Thomas, P., and Fenech, M. (2011). Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol* 682, 235-248.

Thomas, P. et al., 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 4(6), pp.825–837.

Thomas, P. et al., 2007. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*, 22(6), pp.371–379.

Thomas, P. et al., 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 638(1–2), pp.37–47.

Tolbert, P.E., Shy, C.M and alle, J.W (1992).micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 271, 69-77.

Torres, C.H. et al., 2008. Evaluación del daño en el ADN y vigilancia biológica de la exposición laboral a solventes orgánicos , 2006. , pp.126–138.

OMS. (2014). *Perfiles oncológicos de los países, 2014*. Recuperado el 3 de 11 de 2017, de <http://www.who.int/cancer/country-profiles/es/>

OMS. (2014). *Protección de la salud de los trabajadores*. Recuperado el 2017 de 10 de 28, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs389/es/>

OMS. (2017). *Cáncer*. Recuperado el 28 de 8 de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

OPS. (2017). Expertos de Cáncer en la Región de las Américas Discuten sobre una Nueva Iniciativa sobre Prevención del Cáncer en América Latina y el Caribe. Recuperado el 28 de 10 de 2017, de ALC: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13203%3Anew-initiative-cancer-prevention-lac&catid=3788%3Acancer-events&Itemid=42322&lang=es

OPS, & OMS. (2014). La OPS/OMS advirtió sobre el riesgo para la salud de la exposición a sustancias químicas cancerígenas en el lugar de trabajo. Recuperado el 25 de 7 de 2017, de IARC: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9504%3A2014-pahowho-warns-of-health-risks-from-occupational-exposure-to-chemical-carcinogens&catid=1443%3Aweb-bulletins&Itemid=135&lang=es

OPS, & OMS. (2017). *Día Mundial contra el cáncer 2017*. Recuperado el 3 de 11 de 2017, de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12910&Itemid=41707&lang=es

Orta, T., & Günebakan, S. (2012). The effect of aging on micronuclei frequency and proliferation in human peripheral blood lymphocytes. *Indian journal of human genetics*, 18(1), 95.

Ortega, V., and Arenas, A (2013), Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal en personas ocupacionalmente expuestas a solventes orgánicos. In *Biología* (Universidad del Cauca).

Proexport. (2009). Recuperado el 3 de 11 de 2017, de <http://www.procolombia.co/>

Vitali, M. et al., 2006. Exposure to Organic Solvents among Handicraft Car Painters : A Pilot Study in Italy. , pp.310–317.

Viégas, J. et al., 2002. Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages. , 500, pp.495–500.

Vondracek, M. et al., 2001. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis*, 22(3), pp.481–488.