

**EFICIENCIA DE REPARACIÓN DE LESIONES EN EL ADN Y SU ASOCIACIÓN
CON EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN XRCC1 EN UNA
POBLACIÓN EXPUESTA OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS
Y PINTURAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

MARÍA BELÉN TRUJILLO H.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2008**

**EFICIENCIA DE REPARACIÓN DE LESIONES EN EL ADN Y SU ASOCIACIÓN
CON EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN XRCC1 EN UNA
POBLACIÓN EXPUESTA OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS
Y PINTURAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

MARÍA BELÉN TRUJILLO H.

**Trabajo de grado
para optar al título de Bióloga**

**Directora
Magíster Luz Stella Hoyos Giraldo**

**Asesor
Magíster Silvio Marino Carvajal**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2008**

Nota de Aceptación

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Director

Popayán, Julio 29 de 2008

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida
A mi madre y mi hermana por apoyarme en todo momento y lugar
A mis maestros y profesores que me enseñaron más que la ciencia
A mis compañeros, amigos y conocidos por su apoyo, compañía y colaboración
incondicional.
Al panda por mostrarme el camino
Gracias

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. HIPÓTESIS	6
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVOS	9
4.1 GENERAL	9
4.2 ESPECÍFICOS	9
5. ANTECEDENTES	10
6. MARCO TEÓRICO	16
6.1. SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS	16
6.2. DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR QUÍMICOS (SOLVENTES ORGÁNICOS)	17
6.3 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A MUTÁGENOS PARA EVALUAR EFICIENCIA DE REPARACIÓN	18

6.4 POLIMORFISMO GENÉTICO	19
6.5 REPARACIÓN DEL ADN	20
6.6. GEN DE REPARACIÓN XRCC1 Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS	20
6.6.1. Gen XRCC1	20
6.6.2. Polimorfismo del gen XRCC1	21
6.7. BIOMARCADORES, EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y MONITOREO DE POBLACIONES	24
7. METODOLOGÍA	25
7.1. TIPO DE ESTUDIO	25
7.2. SELECCIÓN DE VARIABLES	25
7.3 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE MUESTRA	26
7.4. SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	26
7.4.1. Criterios de selección y exclusión	26
7.4.2. Selección del grupo expuesto	26
26	
7.4.3. Selección del grupo de individuos de referencia (no expuestos)	26

7.4.4. Consentimiento informado	27
7.4.5. Obtención y procesamiento de la información	27
7.5. TOMA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	27
7.6. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A MUTÁGENOS PARA EVALUAR EFICIENCIA EN LA REPARACIÓN	27
7.6.1. Cultivos celulares y tratamientos con Mitomicina C 27	
7.6.2. Cosecha celular	28
7.6.3. Montaje de las preparaciones citogenéticas, tinción, observación y registro	28
7.7. GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN XRCC1 POR PCR-RFLPs	29
7.7.1. Aislamiento de linfocitos por el método de Ficoll-Histopaque	29
7.7.2. Extracción de ADN por el Kit de Quiagen	29
7.7.3. Condiciones de amplificación (PCR)	29
7.7.4. Polimorfismos genéticos (RFLPs)	30
7.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	30

8. RESULTADOS	31
8.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN	31
8.2. EFICIENCIA DE REPARACIÓN DE LESIONES INDUCIDAS <i>In Vitro</i> CON MMC EN EL ADN ENTRE GRUPOS	31
8.3. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS <i>In vitro</i> CON MMC.	33
8.4. MODULACION DEL GEN XRCC1 (CODÓN 194 Y 399) SOBRE LA FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS <i>In</i> <i>vitro</i> CON MMC.	34
8.5. RELACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN, EL GENOTIPO DEL GEN XRCC1 (CODÓN 194 Y 399), Y LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS <i>In vitro</i> CON MMC.	34
8.6. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LOS RESULTADOS	36
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	45
11. RECOMENDACIONES	46
12. IMPACTO	47
BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resumen de las más relevantes referencias bibliográficas.	13
Tabla 2. Variables relacionadas en el estudio	25
Tabla 3. Resumen de diseño experimental para la prueba de sensibilidad a mutágenos.	28
Tabla 4. Características demográficas de la población	32
Tabla 5. Relación entre el grupo de individuos de referencia y expuestos con respecto al promedio de alteraciones cromosómicas inducidas <i>in vitro</i> con MMC.	32
Tabla 6. Alteraciones cromosómicas inducidas <i>In vitro</i> con MMC (Individuos de referencia y Expuestos) asociadas a los genotipos del gen XRCC1 codón 194 y 399.	35
Tabla 7. Alteraciones cromosómicas inducidas <i>In vitro</i> con MMC (AC), asociadas a la exposición (Individuos de referencia/expuestos) y al genotipo del gen XRCC1 codón 194 y 399.	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema del ingreso y metabolismo de una sustancia exógena. Si la sustancia exógena no es eliminada o detoxificada induce daños en el ADN, donde la última línea de protección es la reparación	17
Figura 2. Proteína XRCC1 y su interacción con enzimas que participan en el proceso de Reparación por Escisión de Bases (BER). NTD: Dominio N-Terminal; NLS: Señal de localización nucleolar; BRCT: Carboxilo terminal BRCA. Las líneas punteadas muestran los dominios donde ocurren las interacciones.	21
Figura 3. Patrón de bandas del producto de amplificación para PCR multiplex. Las bandas de 615pb y 419pb corresponden al exón 10 (posición 399) y al exón 6 (posición 194), respectivamente.	22
Figura 4. Diagrama del patrón de bandas para la digestión de los productos de amplificado del gen XRCC1 codones 194 y 399; contiene las posibles combinaciones de bandas.	22
Figura 5. Origen del valor numérico de las Alteraciones cromosómicas inducidas	30
Figura 6. Relación entre el grupo de individuos de referencia y expuestos con respecto al promedio de alteraciones cromosómicas inducidas <i>In vitro</i> con MMC de tipo cromatídico, cromosómico y totales.	33
Figura 7. Análisis de interacción entre la edad y el tiempo de exposición en cuanto a las alteraciones cromosómicas inducidas <i>In vitro</i> con MMC <u>a.</u> Edad Vs. alteraciones cromosómicas inducidas, <u>b.</u> Tiempo de exposición Vs. alteraciones cromosómicas inducidas.	34
Figura 8. Alteraciones cromosómicas inducidas <i>In vitro</i> con MMC (AC), asociadas a la exposición (Individuos de referencias/Expuestos) y al genotipo del gen XRCC1 codón 194 y 399.	36
Figura 9. Metafases de linfocitos de sangre periférica con 46 cromosomas <u>a.</u> Metafase normal <u>b.</u> 1 Alteración de tipo cromatídico (Act) <u>c.</u> 3 Alteración de tipo cromatídicos. <u>d.</u> 1 Alteración de tipo cromatídico y 1 Alteración de tipo cromosómico (Acm).	36

Figura 10. Patrón de bandas para la digestión del producto de amplificado del PCR multiplex para el gen XRCC1 codón 194 y 399. Carril 1: producto de amplificado (Amp.), las bandas corresponden a 615pb para el codón 399 y 491pb para el codón 194; Carril 2: las bandas corresponden al genotipo silvestre194 /silvestre 399; Carril 3: las bandas corresponden al genotipo silvestre194 /heterocigótico 399; Carril 4: las bandas corresponden al genotipo silvestre194 /homocigótico mutante 399; Carril 5: las bandas corresponden al genotipo homocigótico mutante 194 /silvestre 399; Carril6: las bandas corresponden al genotipo heterocigótico 194/silvestre 399; Carril7: las bandas corresponden al genotipo silvestre194/silvestre 399. Gel de agarosa al 3%.

37

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Encuesta Corta	60
Anexo B. Encuesta Larga	61
Anexo C. Consentimiento Informado	64

LISTADO DE SIGLAS

A.cm	Alteración de tipo cromosómico
A.ct	Alteración de tipo cromatídico
AC	Alteraciones cromosómicas
ACGIH	The American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AP	Sitio Apurínico
Arg	Arginina
BE	Biomarcador de Efecto
BER	Reparación por Escisión de bases
BEx	Biomarcador de Exposición
BS	Biomarcador de susceptibilidad
EV	Epidermodisplasia verruciforme
Gln	Glutamina
GST	Glutathione S-transferase
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICHs	Intercambio de Cromátidas Hermanas
MMC	Mitomycin C
MMR	Reparación de Bases Mal Apareadas
Mn	Micronúcleos
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ácido Ribonucleico
SM	Sensibilidad a Mutágenos
Trp	Triptófano
XRCC1	X-ray repair cross-complementing

EFICIENCIA DE REPARACIÓN DE LESIONES EN EL ADN Y SU ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN XRCC1 EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA A SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

Trujillo H. María Belén ¹, Hoyos G. Luz Stella ², Carvajal V. Silvio M. ²

Estudiante¹, Docente². Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Popayán. Colombia. belentru@unicauca.edu.co, lshoyos@unicauca.edu.co.

Según la IARC* (1989) existe “evidencia suficiente” en humanos y animales de carcinogenicidad por la exposición ocupacional en pintores. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto en la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN inducidas por la Mitomicina C (MMc) (prueba de sensibilidad a mutágenos), en una población ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos y pinturas y su modulación por el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 (codones 194 y 399). Se encuestó y seleccionó una muestra de 50 pintores, expuestos por un tiempo ≥ 5 años y no fumadores los cuales fueron emparejados por edad con un grupo referente de 50 individuos, quienes firmaron un consentimiento informado. Se tomó una muestra de sangre para realizar los cultivos de linfocitos, los cuales fueron tratados a las 67h con MMc (0.25mM) y cosechadas a las 72h previo tratamiento con colcemid. De las preparaciones citogenética coloreadas con giemsa y codificadas se registró el número de alteraciones cromosómicas (AC) en 50 metafases, para cada individuo (expuestos y referentes) y se restó el número de AC basales correspondientes para cada individuo (sin tratamiento con MMc), esta diferencia se considera el número de AC inducidas con MMc. Para caracterizar el polimorfismo del gen XRCC1 codón 194 (Arg/Trp) y 399 (Arg/Gln), se extrajo ADN y se realizó PCR-multiplex/RFLPs con la enzima *MspI*; los datos se procesaron y analizaron con el programa SPSS versión 14, con pruebas no paramétricas. Se observó una diferencia significativa estadísticamente ($P=0.003$) para las AC inducidas entre el grupo expuesto ($1,66\pm 0,298$) y el grupo referente ($0,54\pm 0,229$), lo que sugiere que la exposición a solventes orgánicos y pinturas influye en la eficiencia de reparación de lesiones inducidas en el ADN, además se encontró una interacción estadísticamente significativa entre la exposición y el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 codón 194 y 399 ($P=0.009$ y $P= 0,016$) desde el punto de vista de las AC inducidas, lo que indica que posiblemente los individuos con el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 codón 194 y 399, específicamente el genotipo Arg194Trp y Gln399Gln son más susceptibles a la exposición. Estos hallazgos alertan y motivan al diseño e implementación de planes de prevención y promoción en poblaciones expuestas a solventes orgánicos y pinturas.

*(International Agency for Research on Cancer)

Palabras claves: exposición ocupacional, susceptibilidad genética, sensibilidad a mutágenos, eficiencia de reparación, polimorfismo del gen XRCC1, PCR multiplex/RFLPs.

INTRODUCCIÓN

Los solventes orgánicos y las pinturas son mezclas complejas que contienen entre 96 y 205 compuestos químicos como toluenos, xilenos, alcoholes, acetona, benceno, entre los más conocidos. Entre estos, algunos como el benceno y el tolueno se han asociado con el desarrollo de cáncer (Piscoya, 2000). La industrialización ha incrementado la exposición individual a una variedad de químicos, principalmente, ante una exposición ocupacional. La IARC (1989) afirmó que existe “evidencia suficiente” en humanos y animales de carcinogenicidad por la exposición ocupacional en pintores. Sin embargo, en Colombia y, especialmente, en el Cauca, los individuos ocupacionalmente expuestos no tienen un concepto y una aplicación del adecuado manejo de estas sustancias, por lo cual los solventes orgánicos y las pinturas tienen mayor probabilidad de ingresar a sus organismos. Los productos activos generados a través del metabolismo de los solventes son capaces de interactuar en el organismo con el ADN y de producir lesiones primarias que, en muchos casos, no son reparadas o son mal reparadas y pueden fijarse, produciendo mutaciones en el ADN.

La reparación correcta y eficiente determina la protección para la integridad del ADN y de la célula. La eficiente reparación o la no reparación son influenciadas por la susceptibilidad genética (factores genéticos innatos) y la susceptibilidad adquirida (factores ambientales), asociados con un mayor riesgo de desarrollar problemas de salud, como el cáncer. La deficiente reparación del ADN está involucrada en el proceso de la carcinogénesis (Erdei, *et al.*, 2006).

La prueba de sensibilidad a mutágenos desarrollada por Hsu (1983) es un ensayo que permite medir la capacidad de reparación del ADN de manera indirecta, con el uso de un agente inductor de lesiones primarias en el ADN. Los diferentes tipos de daño son reparados por diferentes vías de reparación (Reparación por Escisión de Bases –BER–, Reparación por Escisión de Nucleótidos –NER–, etc.). Para este estudio se usó la mitomicina C como agente inductor de lesiones, el cual causa alquilación en el ADN y *cross links* en secuencias CpG. Así, la principal vía de reparación evaluada fue BER, ya que ésta repara lesiones causadas por estrés oxidativo, por agentes alquilantes, y sitios apurínicos (AP) (Caldecott, 2003).

La proteína multidominio XRCC1 interviene en BER como una proteína de acople de otras proteínas que interactúan directamente con el ADN para efectuar el proceso de reparación. Ahora bien, en el gen XRCC1 se han identificado polimorfismos que alteran algunas regiones del gen que modifican los dominios de unión proteína-proteína o que están

cercanos a ellos (Shen, *et al.*, 1998). En consecuencia, al alterar estos dominios de unión, posiblemente también se alterará la capacidad de reparación.

Para este estudio se tomó una población de 50 individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas y un grupo de referencia de 50 individuos no expuestos, todos ellos sanos, no fumadores, los cuales fueron emparejados por edad. A estos individuos se les tomó una muestra de sangre para realizar la prueba de sensibilidad a mutágenos, evaluada mediante el registro de alteraciones cromosómicas. Se extrajo ADN para la genotipificación del gen XRCC1 codón 194 y 399 por PCR-Multiplex-RFLPs. Se evaluó la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN en linfocitos de sangre periférica en un grupo de individuos de referencia y de individuos ocupacionalmente expuestas a solventes orgánicos y pinturas, también se evaluó la modulación por el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 (codón 194 y 399), con el fin de identificar susceptibilidad en los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas, y de motivar el diseño y la implementación de medidas de prevención y promoción de la salud en individuos y poblaciones en riesgo de desarrollar enfermedades, como el cáncer, por la exposición a agentes genotóxicos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pinturas son mezclas complejas que tienen entre 96 y 205 compuestos químicos como toluenos, xilenos, alcoholes, acetona, benceno y estireno, entre los más conocidos; de los cuales algunos se han asociado con el desarrollo de cáncer, tal como ocurre con el benceno y el tolueno, asociados con la leucemia (Piscoya, 2000) y con la posible carcinogenicidad del estireno (IARC, 1994). Los trabajadores pueden estar expuestos a una variedad de compuestos (carcinogénicos mutagénicos) que dañan el ADN como resultado de su ocupación y de su ambiente de trabajo (Faust, *et al.*, 2004).

Aunque el aumento de los solventes orgánicos y las pinturas en el mercado es considerable, su adecuado manejo no ha trascendido. Culturalmente no existe un concepto y una aplicación de la bioseguridad ni del autocuidado. Por una parte, la información de los individuos ocupacionalmente expuestos acerca de los efectos genotóxicos de los solventes orgánicos y las pinturas es casi inexistente, debido al bajo nivel de escolaridad de estos trabajadores. Por otra parte, el problema también se puede atribuir al descuido de las personas que manejan estas sustancias. Los individuos ocupacionalmente expuestos no emplean medidas de protección básicas, tales como guantes, mascarar, ropa de trabajo de algodón o ambientes ventilados para el desarrollo de su trabajo. Aun así, un pequeño porcentaje de individuos es conciente de los posibles daños que causan estas sustancias, pero la falta de medidas de protección se escuda en los altos costos de los implementos destinados para este propósito, de tal suerte que sacrifican la protección por el ahorro.

Es usual encontrar que las personas que trabajan con pinturas manifiestan molestias en su salud en el momento del manejo y la manipulación de los compuestos químicos (pinturas y solventes), entre ellas: irritaciones de piel y mucosas, dolores de cabeza y mareos (Rodríguez *et al.*, 2001; Comisión nacional del medio ambiente–región metropolitana de Santiago de Chile, 1999). Estas molestias se pueden clasificar como problemas a corto plazo; sin embargo, en los individuos que presentan una mayor exposición, los químicos tienen más probabilidades de interactuar con las macromoléculas como el ADN y entre otras generar lesiones primarias (aductos), que al no ser reparadas o al ser mal reparadas pueden expresarse en la célula como mutaciones, evento inicial en el proceso de la carcinogénesis. Este tipo de enfermedades que no presentan sintomatologías tempranas para el individuo, no son tratadas; además no hay planes de educación que informen a la población sobre la importancia de la prevención.

El cuerpo humano es capaz de absorber, procesar y desechar compuestos químicos, tratando de mantener en óptimas condiciones la integridad de su sistema; no obstante, los

límites que presenta el sistema se ven reflejados cuando los químicos que ingresan no tienen una ruta de procesamiento y eliminación posterior, o bien cuando la exposición a los químicos se vuelve constante y excede las dosis manejables por el cuerpo, como en el caso de los pintores de automóviles, quienes se encuentran en una constante exposición a compuestos químicos muy volátiles. Según la IARC (International Agency for Reserch on Cancer) (1989), “La ocupación de los pintores es un oficio carcinogénico para el hombre”, confirmando el riesgo de esta ocupación. En conclusión, al ser los solventes orgánicos mezclas complejas, muchos de los compuestos que los conforman tienen acción promutagénica, mutagénica y hasta carcinogénica, como es el caso del benceno, un hidrocarburo aromático de reconocida acción carcinogénica (Rodríguez, *et al.*, 2003), el estireno (Laffon, *et al.*, 2002) y el tolueno (Plappert, *et al.*, 1994) entre otros.

Ahora bien, el Proyecto del Genoma Humano y principalmente el Proyecto del Genoma Ambiental, han hecho énfasis en la implementación del uso de biomarcadores que permitan hacer una predicción aproximada del potencial riesgo de desarrollar problemas de salud y de susceptibilidad en los individuos expuestos a mutágenos ambientales, dado que se ha confirmado la interacción gen-ambiente que determina una susceptibilidad variable entre individuos expuestos. Prüss-Üstün y Corvalán (2006) del Instituto Mundial de la Salud afirman que “el 24% de la carga de morbilidad mundial y el 23% de todos los fallecimientos pueden atribuirse a factores ambientales”.

La diferente respuesta biológica a agentes genotóxicos por la exposición ambiental/ocupacional puede ser evaluada con los biomarcadores de susceptibilidad. Sin embargo, los estudios que utilizan este tipo de biomarcadores son muy pocos a nivel mundial, más aun para el caso de la evaluación de poblaciones ocupacionalmente expuestas. En el departamento del Cauca, los estudios para evaluar la exposición ocupacional utilizando biomarcadores de susceptibilidad, no se han implementado, aunque algunos estudios usando otro tipo de biomarcadores (Biomarcadores de efecto) han permitido, en este mismo departamento, identificar poblaciones en riesgo y, principalmente, alertar a estas poblaciones sobre dicho riesgo; logrando formular medidas de prevención.

La prueba de sensibilidad a mutágenos (Biomarcador de susceptibilidad) se usa como un indicador de la eficiencia de reparación (Hsu, *et al.*, 1981 Au, *et al.*, 2001) y, con la ayuda de las técnicas como el PCR y RFLPs para la identificación de susceptibilidad innata, se ha hecho posible genotipificar genes que intervienen en el metabolismo (activación, detoxificación) y la reparación del ADN, que determinan un estado de protección o de riesgo individual ante la exposición a compuestos ambientales. De esta forma, es posible identificar individuos en mayor y menor riesgo.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto en la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN inducidos por la Mitomicina C (*in vitro*) en una población ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos y pinturas y su modulación por el polimorfismo del gen de reparación XRCC1. Las preguntas que se pretendieron responder fueron: ¿La exposición ocupacional a los solventes orgánicos y las pinturas altera la eficiencia de reparación del ADN?, ¿El tiempo de exposición a solventes orgánicos y pinturas está asociado con la eficiencia de reparación de daños en el ADN inducidos por el mutágeno mitomicina C?, ¿La edad de los individuos objeto de estudio está asociada con la eficiencia de reparación de daños en el ADN inducidos por el mutágeno mitomicina C? y ¿El polimorfismo del gen XRCC1 (194 y 399) está asociado con la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN, evidenciada en el aumento de las alteraciones cromosómicas de linfocitos tratados con mitomicina C?

2. HIPÓTESIS

Si la exposición ocupacional crónica a solventes orgánicos y pinturas, influye sobre la eficiencia en la reparación de lesiones inducidas por mitomicina C (sensibilidad a mutágenos), se espera un incremento significativo en la frecuencia de alteraciones cromosómicas, en el grupo de los expuestos respecto al grupo de individuos de referencia.

Si el genotipo (gen XRCC1 codón 194 y 399), modula la sensibilidad a mutágenos, se espera que, la presencia de determinados alelos este asociada al número de alteraciones cromosómicas inducidas con mitomicina C.

Si entre el factor ambiental (exposición a solventes orgánicos) y el factor genético (polimorfismos del gen XRCC1 codón 194 y 399) existe dependencia, se espera, que las personas expuestas a solventes orgánicos y pinturas que presenten alelos asociados a la deficiencia en la reparación, presenten un incremento significativo de alteraciones cromosómicas inducidas por el mutágeno conocido mitomicina C, con respecto a las personas que presentan alelos asociados a la eficiencia en la reparación y pertenezcan al grupo de individuos de referencia.

3. JUSTIFICACIÓN

La exposición a solventes orgánicos, es un problema de salud pública. La IARC, en 1989, clasificó “La ocupación de los pintores como una ocupación carcinogénica para el hombre” Además, es ampliamente aceptado que la exposición a químicos ambientales esta asociada con un elevado riesgo de cáncer (Doll y Peto, 1981). No todas las personas son igualmente susceptibles ante la exposición de agentes genotóxicos, solo algunas desarrollan problemas de salud por la exposición ocupacional, luego es importante realizar estudios en los cuales se incluyan biomarcadores de susceptibilidad para identificar individuos y/o grupos más o menos susceptibles. La prueba de sensibilidad a mutágenos basado en el registro de alteraciones cromosómicas permite evaluar la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN e identificar individuos más susceptibles y en mayor riesgo de desarrollar problemas de salud determinados por la exposición a agentes genotóxicos y la sensibilidad a mutágenos. Au *et al.*, (2001), hace énfasis en “el uso de biomarcadores que puedan detectar deficiencias en la reparación del ADN y sensibilidad a mutágenos en poblaciones humanas como un indicador de susceptibilidad a la enfermedad”

La susceptibilidad está determinada por factores genéticos y ambientales. Según Loeb *et al.*, (1997), y Lengauer *et al.*, (1997), las células de personas expuestas a mutágenos ambientales (como algunos solventes orgánicos), expresan una inestabilidad genética o “fenotipo mutador”, lo que conlleva a la acumulación de mutaciones oncogénicas (Wilson *et al.*, 1999), lo cual, confirma la influencia del ambiente sobre la susceptibilidad adquirida. La susceptibilidad genética se ve influenciada por la capacidad que tenga el organismo para biotransformar compuestos exógenos; cada individuo posee ciertas diferencias que pueden determinan protección o vulnerabilidad, principalmente en sistemas en los que se pone en juego la integridad del genoma. Según Norppa (2004), cualquier polimorfismo que tenga su efecto en el metabolismo de xenobióticos o respuesta celular ante el daño en el ADN (reparación), puede alterar la susceptibilidad individual a los agentes xenobióticos (genotóxicos y carcinógenos). Además, se afirma por varios autores, que los genes de reparación de lesiones en el ADN tienen un rol crítico en la protección del genoma (Bohr, 1995, Chu y Mayne, 1996, Mohrenweiser y Jones, 1998). Los polimorfismos del gen XRCC1 pueden conferir susceptibilidad, ya que este gen interviene como el mediador de la interacción entre proteínas que participan en el proceso de la reparación por escisión de base, una de las principales rutas de reparación de algunos de los daños producidos por los compuestos de los solventes orgánicos y pinturas. Según Lunn *et al.* (1999), la reparación del ADN puede modular la susceptibilidad al cáncer. Por lo cual se hace de vital importancia poder predecir tempranamente los posibles riesgos por la exposición ambiental/ocupacional en los individuos más susceptibles.

La prueba de sensibilidad a mutágenos es indicador indirecto de la capacidad individual de reparación del ADN (Cloos, *et al.*, 1999), la prueba permite predecir tempranamente los posibles riesgos de desarrollar problemas de salud por la exposición ocupacional a agentes genotóxicos (Biomarcador de susceptibilidad). Una de las mayores ventajas de la prueba de sensibilidad a mutágenos radica en que es una de las pocas pruebas *in Vitro*, que tiene la posibilidad de evaluar la capacidad de reparación, evento asociado al proceso de la carcinogénesis (Hsu, *et al.*, 1989, Spitz, *et al.*, 1995), y con síndromes genéticos (relacionados o no con la reparación) (Otsuka, *et al.*, 1985; Parshad, *et al.*, 1996). Al evaluar la reparación la prueba de sensibilidad a mutágenos se perfila como una herramienta muy útil y de alta sensibilidad.

En este estudio se empleó la prueba de alteraciones cromosómicas (AC) como biomarcador para la prueba de sensibilidad a mutágenos. El biomarcador de AC es el primero que ha mostrado asociación con riesgo de cáncer. Resultados de algunos estudios han mostrado que “la asociación entre la frecuencia de AC y la subsiguiente incidencia de mortalidad e incidencia de cáncer no fue modificada por el sexo, la edad, el país, la exposición a carcinógenos ocupacionales y los hábitos de fumar” (Hagmar, *et al.*, 2004), la justificación de la no asociación encontrada para con los anteriores factores se atribuyó a la susceptibilidad genética/adquirida que puede tener un efecto modulador.

Este estudio es coherente con los objetivos del Proyecto Genoma Humano (2007), el cual es “entender la contribución de la genética en la salud humana”. También es coherente con el objetivo del Proyecto Genoma Ambiental (2007) el cual es “entender como los individuos difieren en susceptibilidad (Genética y Adquirida), a los agentes ambientales y como esta susceptibilidad influye a través del tiempo”. Además es de anotar que para la evaluación de poblaciones en riesgo en el departamento del Cauca no se habían empleado biomarcadores de susceptibilidad, y en el departamento del Cauca y en Colombia la exposición a solventes orgánicos y pinturas es todavía un problema de salud pública.

Ahora bien, Matsuo, *et al.*, (2004), afirma que se requiere de la realización de estudios de asociación entre la exposición ambiental/ocupacional, efectos genotóxicos, susceptibilidad y el polimorfismo genético, los cuales permiten identificar la interacción gen-ambiente determinante de la variabilidad en la respuesta biológica a la exposición ocupacional. Por lo anterior, el interés sobre este estudio, el cual evaluó el efecto en la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN inducidos por la Mitomicina C (*in vitro*) en una población ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos y pinturas y su modulación por el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 con el fin de identificar susceptibilidad en los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas, y motivar al diseño e implementación de medidas de prevención y promoción de la salud de individuos y poblaciones en riesgo de desarrollar problemas de salud, como el cáncer, por la exposición a agentes genotóxicos.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Evaluar el efecto en la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN inducidos por la Mitomicina C (*in vitro*) en una población ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos y pinturas y su modulación por el polimorfismo del gen de reparación XRCC1.

4.2 ESPECÍFICOS

Estandarizar la amplificación y la genotipificación de los polimorfismos del gen de reparación XRCC1 codón 194 y 399 por PCR multiplex/RFLPs.

Comparar la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN inducidos por la mitomicina C en linfocitos de sangre periférica en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas con relación al grupo de individuos de referencia mediante la prueba de sensibilidad a mutágenos.

Caracterizar el polimorfismo genético del gen de reparación XRCC1 en los codones 194 y 399 en la población objeto de estudio por PCR/RFLPs.

Asociar la eficiencia de reparación de lesiones inducidas en el ADN por mitomicina C en linfocitos de sangre periférica y los polimorfismos del gen XRCC1 (codón 194 y 399), en la población objeto de estudio.

5. ANTECEDENTES

La primera asociación del trabajo como agente causal de enfermedad fue descrita por Percival Pott en 1775; él encontró que un considerable número de limpiadores de chimeneas presentaban cáncer de escroto. Este hallazgo motivo hacia una nueva visión del desarrollo de la enfermedad (relacionándola con factores ambientales y ocupacionales), así como, la visión de “la prevención temprana”. El estudio de la asociación entre la ocupación y el desarrollo de problemas de salud continuó con el aumento en los estudios de biomonitorio en poblaciones expuestas a químicos (mutagénicos/carcinogénicos).

Para el biomonitorio de poblaciones se han usado diferentes biomarcadores (Norppa, 2004). Entre los biomarcadores más frecuentemente empleados están las alteraciones cromosómicas (AC), considerado como “la prueba de oro” para la documentación de efectos biológicos en poblaciones expuestas (Au, *et al.*, 1996), además esta prueba ha sido validada para predecir el potencial riesgo de desarrollar cáncer (Hagmar *et al.*, 1994, 1998; Bonassi *et al.*, 1995). También es ampliamente usada la prueba de intercambio de cromátides hermanas (ICHs), la prueba de micronúcleos (Mn) (Bonassi, *et al.*, 2005), y el ensayo cometa (Laffon, *et al.*, 2004). Cabe resaltar que, muy pocos estudios han incluido biomarcadores de susceptibilidad (Au, *et al.*, 1995; 2001; Tedeschi, *et al.*, 1996).

Ahora bien, los trabajadores pueden estar expuestos a una variedad de compuestos (carcinogénicos mutagénicos) que dañan el ADN o biomoléculas importantes como resultado de su ocupación y de su ambiente de trabajo (Faust, *et al.*, 2004). Au *et al.* (2001) hipotetizaron que “una prolongada exposición puede causar acumulación de células anormales”. Un buen número de estudios, han evaluado a trabajadores ocupacionalmente expuestos a diferentes tipos de sustancias como benceno (Hallberg, *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999, Kasuba *et al.*, 2000), etileno (Bogaard *et al.*, 1999), oxido de propileno (Czue *et al.*, 2002) entre otros. La acción de tóxicos ambientales tales como los solventes orgánicos, se puede apreciar como una causa notoria del aumento en el riesgo de desarrollar cáncer. Los solventes orgánicos producen especies reactivas de oxígeno que se han asociado como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer (Stern, *et al.*, 2001). La IARC (International Agency for Reserch on Cancer), en 1989, clasificó al trabajo con pinturas como una causa ocupacional directamente relacionada con la aparición de cáncer. Al igual que la IARC, Brown *et al.*, (2002), basados en registros locales (censo) de 1960 y 1970 y registros de cáncer de 1971 a 1989 de Swedish, reportaron una alta correlación entre personas expuestas ocupacionalmente a pinturas y a solventes orgánicos con el desarrollo posterior de cáncer. Además, se ha demostrado la absorción y posterior metabolismo de solventes orgánicos en una población italiana de pintores de automóviles, en esta población la concentración de los

componentes como el tolueno, el n-butilacetato y el xileno en el aire y los niveles de metabolitos en orina presentaron una relación significativa (Vitali, *et al.*, 2006).

La prueba de sensibilidad a mutágenos o challenge fue desarrollada para evaluar la eficiencia de reparación (Hsu y Au *et al.*, 1981; Parshad *et al.*, 1985). Hsu *et al.* (1989), expuso linfocitos *in vitro* a un tratamiento con bleomicina (Químico radiomimético, mutagénico), el cual uso para inducir daños en el ADN. A una población de 230 pacientes con cáncer y 335 controles, les realizó la prueba de alteraciones cromosómicas sin bleomicina (alteraciones de células sin tratamiento), y con bleomicina (respuesta de reparación), encontrando que un número significativo de pacientes con cáncer eran sensibles a mutágenos, presentando una deficiencia en la capacidad de reparación. Posteriores estudio también mostraron un incremento significativo de personas con cáncer que presentaban sensibilidad a mutágenos con respecto al grupo de individuos de referencia en cáncer de cuello y cabeza (Hsu *et al.*, 1989, Spitz, *et al.*, 1989), y cáncer de pulmón (Spitz *et al.*, 1995).

Para el caso de la prueba de challenge los linfocitos fueron expuestos *in vitro* a agentes físicos como rayos X, gama y UV durante la fase G₀ o G₁ del ciclo celular, registrando alteraciones cromosómicas (Au *et al.*, 2001). Presumiendo que este ensayo (challenge) detecta la deficiencia en la reparación de quiebres en el ADN. Shafit, *et al.*, (1988) usando rayos X demostraron que los linfocitos de pacientes con síndrome de Dawn son sensibles a la inducción de daños cromosómicos. El-Zein *et al.*, (1995) usando células basales del síndrome de nevusy de epidermodisplasia verruciforme (EV) encontró que presentaban una respuesta normal en la reparación del ADN, aunque, las células de EV mostraron una reparación anormal ante la exposición a rayos UV.

También se realizaron pruebas combinadas con diferentes tipos de mutágenos para la realización de la prueba de sensibilidad a mutágenos; encontrando que los linfocitos de pacientes con cáncer expuestos a rayos UV y a bleomicina expresaban una deficiencia significativa en la reparación del ADN con relación a pacientes control (Wei, *et al.*, 2005). En dos estudios similares se asoció la sensibilidad a mutágenos con un incremento en la mortalidad por cáncer, especialmente con leucemia, cáncer de pulmón y de riñón (López-Abente *et al.*, 1999, 2001). Las investigaciones en pacientes con cáncer que expresan sensibilidad a mutágenos son el principio para el estudio de la exposición ambiental a mutágenos y la susceptibilidad individual (Au, 2003). Numerosas investigaciones han mostrado que el ensayo de sensibilidad a mutágenos es un marcador de susceptibilidad a cáncer lo que ha incrementado la utilización de esta prueba sobre todo en experimentos para determinar la susceptibilidad de individuos y poblaciones expuestas.

En poblaciones expuestas la prueba de sensibilidad a mutágenos se ha empleado para evaluar diferentes agentes. Se encontró que las células de individuos expuestos a bajas

concentraciones de estireno, ante una radiación ionizante, presentaban un significativo incremento de AC comparados con el grupo de individuos de referencia (Oberheitmann *et al.*, 1999). De igual manera en poblaciones expuestas a uranio se determinó sensibilidad y potenciales riesgos de salud (Au *et al.*, 1995). En poblaciones expuestas a radiación específicamente en niños que estuvieron en el accidente de Chernobyl se encontró que la respuesta de sus células ante una radiación ionizante *in Vitro* presentaban un cierto tipo de adaptación, de tal forma la respuesta de reparación tuvo un incremento con respecto a los controles (Padovani, *et al.*, 1995), sin embargo, se reportó sensibilidad a mutágenos de estas células con la aplicación de bleomicina (Tedeschi, *et al.*, 1996). La principal relevancia de la prueba de sensibilidad a mutágenos radica en que la frecuencia de alteraciones cromosómicas inducidas, es una medida indirecta de la eficiencia de los mecanismos de reparación y un predictor del riesgo de cáncer asociado a factores ambientales (Laczmanska, *et al.*, 2007).

El estudio del gen XRCC1 inicio con la capacidad que se le atribuyó para restaurar la reparación del ADN, estudiado en células mutadas EM-9 y EM-11 (células sin el gen XRCC1) de ovario de hamster chino las cuales presentaban hipersensibilidad a agentes alquilantes, al insertar nuevamente el gen XRCC1 en las células observaron la restauración de la reparación (Caldecott *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1990; Zdzienicka, *et al.*, 1992). Estudios *in vivo* demuestran que la ausencia del gen XRCC1 es capaz de provocar letalidad embrionaria en ratones (Rayjean *et al.*, 2005). Se han identificado tres polimorfismos en el gen XRCC1 (codón 194, 399 y 280) (Shen *et al.* 1998), los cuales posiblemente alteren la capacidad de reparación. Arg399Gln mostró relación con la actividad de reparación (Duell, *et al.*, 2000). También se ha encontrado asociación entre el polimorfismo del gen XRCC1 399Gln y la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en fumadores (Lunn, *et al.*, 1999; Duell, *et al.*, 2000), el riesgo de cáncer y células de carcinoma renal (Hitara, *et al.*, 2006). Asociación entre el gen XRCC1 y la susceptibilidad al cáncer gástrico (Seong-Gene, *et al.* 2002). También se ha encontrado asociación para el codón 194Trp y 399Gln y un incremento en el riesgo de padecer de carcinoma colon-rectal en una población egipcia (Abdel- Rahman *et al.*, 2000a).

En una población china se encontró una clara evidencia de que los polimorfismos del gen XRCC1 Trp194Trp y XPD está asociado en el desarrollo de cáncer de pulmón, determinando mayor susceptibilidad (Chen *et al.*, 2002); además otros estudios han asociado al alelo 194Trp con la presencia de cáncer de pulmón (Ratnasinghe *et al.*, 2001; David-Beabes and London, 2001). También el polimorfismo del XRCC1 codón 194 y 399 fue asociado con el incremento en el riesgo de cáncer oral comparado con el genotipo silvestre (Ramachandran, *et al.*, 2006). Pero no solo se ha estudiado la asociación de los polimorfismos del gen XRCC1 con el riesgo de cáncer, sino también con la quimioterapia. En un estudio de asociación entre el codón 399 y la quimioterapia; mostró que pacientes con cáncer colon-rectal avanzado con 399Gln presentaban un incremento en el riesgo de fracasar a la quimioterapia con 5FU/oxaliplatin comparados con los pacientes 399Arg

(Stoehlmacher, *et al.*, 2001). También se ha atribuido parte de la resistencia al Camptothecin por la expresión del gen XRCC1 (Park *et al.*, 2002).

El cambio de Arg194Trp ha sido asociado a una baja sensibilidad in Vitro a la bleomicina (Wang, *et al.*, 2003), y Arg399Gln ha mostrado asociación con altos niveles de aflotoxin B1- aductos de ADN y una alta sensibilidad a la bleomicina (Lunn, *et al.*, 1999; Matullo, *et al.*, 2001), En un estudio dirigido por Au (2001) se encontró una leve asociación entre el polimorfismo del gen XRCC1 194Trp y una significativa asociación entre el polimorfismo 399Gln del gen XRCC1 y el incremento de alteraciones cromosómicas en la prueba de sensibilidad a mutágenos. Aunque en otro estudio no encontró asociación (Palli *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha sugerido que la sensibilidad a mutágenos es parcialmente explicada por polimorfismos genéticos que afectan la reparación del ADN (Tuimala, *et al.*, 2002), y en recientes estudios con gemelos se ha encontrado que la sensibilidad a mutágenos es altamente heredable, por lo que se ha planteado la hipótesis que postula que si los polimorfismos genéticos en genes de reparación tienen una significancia funcional, entonces puede haber una correlación entre genotipo y sensibilidad a mutágenos (Lin, *et al.*, 2007).

Tabla 1. Resumen de las más relevantes referencias bibliográficas.

Autor/año	Población	Pruebas	Conclusión
Alteraciones Cromosómicas y Exposición			
Percival Pott, 1775	Limpiadores de chimeneas presentaban cáncer de escroto.	Exámenes médicos de rutina	Asociación del trabajo como agente causal de enfermedad.
Zhang et al., 1999, Kasuba et al., 2000	Expuestos a Benceno	Alteraciones cromosómicas (AC)	Alta incidencia de ACs con relación al grupo referente
Bogaard et al., 1999	Expuestos a Etileno	Alteraciones cromosómicas	
Czne et al., 2002	Expuestos a Óxido de propileno	Alteraciones cromosómicas	
Roma et al., (2006)	Expuestos a compuestos aromáticos	AC, Mn, cometa, niveles de ácido mucónico hipúrico y metilhipúrico.	↑significativo en la excreción de ácido mucónico para el grupo expuesto además ↑ AC,

			Mn y la longitud de cola en cometa para el grupo expuesto
Hagmar <i>et al.</i> , 1994, 1998; Bonnasi <i>et al.</i> , 1995	--	Metanálisis	AC es considerada como una prueba que permite predecir el potencial riesgo de desarrollar cáncer.
Eficiencia de Reparación/ Prueba de Sensibilidad a Mutágenos			
Caldecott <i>et al.</i> , 1992; Thompson <i>et al.</i> , 1990; Zdzienicka, <i>et al.</i> , 1992	células mutadas EM-9 y EM-11 de ovario de hamster chino		El estudio del gen XRCC1 inicio con la capacidad que se le atribuyó para restaurar la reparación del ADN
Thompson, <i>et al.</i> , 1990; Siciliano, <i>et al.</i> 1986	--	especies reactivas de oxígeno radiaciones ionizantes y agentes alquilantes	gen XRCC1 interviene en la reparación por excisión de base (BER)
Rayjean <i>et al.</i> , 2005	Ratones	in vivo ratones	Demostó que la ausencia del gen XRCC1 es capaz de provocar letalidad embrionaria
Chen <i>et al.</i> , 2002	Individuos con cáncer de pulmón	PCR-RFLPs	Los polimorfismos del gen XRCC1 Trp194Trp y XPD podrían intervenir en el desarrollo de cáncer de pulmón, otorgando mayor susceptibilidad
(Wang, <i>et al.</i> , 2003)	---	Prueba de sensibilidad a mutágenos /PCR-RFLPs	El cambio de Arg399Gln asociado a una alta sensibilidad a la bleomicina

Lunn, et al., 1999; Duell, et al., 2000)	Fumadores	Intercambio de cromátides hermanas	asociación entre el polimorfismo del gen XRCC1 399Gln y la alta frecuencia de ICHs
Gen XRCC1			
Hsu y Au <i>et al.</i> , 1981 y Parshad <i>et al.</i> , 1985	Pacientes con cáncer	Prueba de sensibilidad a mutágenos (bleomicina)	Número significativo de pacientes con cáncer eran sensibles a mutágenos, presentando una deficiencia en la capacidad de reparación.
Hsu <i>et al.</i> , 1989, Spitz, <i>et al.</i> , 1989, 1993	Pacientes con cáncer de cuello y cabeza	Prueba de sensibilidad a mutágenos (bleomicina)	Deficiencia en la capacidad de reparación
Au <i>et al.</i> , 1987	Linfocitos <i>in vitro</i> de individuos sanos	Prueba de sensibilidad a mutágenos (rayos X, gama y UV)	Detectaron la deficiencia en la reparación de quiebres en el ADN.
Shafit, <i>et al.</i> , 1988	Linfocitos de pacientes con síndrome de Dawn	Prueba de sensibilidad a mutágenos rayos X	Sensibles a mutágenos
Oberhitmann <i>et al.</i> , 1999	Expuestos a bajas concentraciones de estireno	Prueba de sensibilidad a mutágenos	incremento de AC comparados con el grupo referente
Au <i>et al.</i> , 1995	Expuestos a uranio	Prueba de sensibilidad a mutágenos	Asociación entre la sensibilidad a mutágenos y el incremento en la mortalidad por cáncer

6. MARCO TEÓRICO

6.1. SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS

Durante el siglo XX con la introducción del petróleo y sus derivados se ha incrementado el uso de químicos en muchos productos comerciales, de uso común como diluyentes, gasolina, engrasantes, pinturas, barnices, limpiadores, productos para el aseo del hogar entre otros. Este tipo de productos involucran una mezcla de solventes orgánicos principalmente de carácter de destilados de petróleo, benceno, acetona, tricloroetileno, tetracloroetileno, tolueno, acetato de etilo, cloruro de metileno, etc. (Rodríguez, *et al.*, 2001). La gama de productos a los que la población en general esta expuesta requiere de un manejo adecuado, ya que pueden llegar a ser tóxicos, principalmente para las personas que ven involucradas estas sustancias con su trabajo y más aun desconociendo la composición de las mismas ni sus alcances en el organismo.

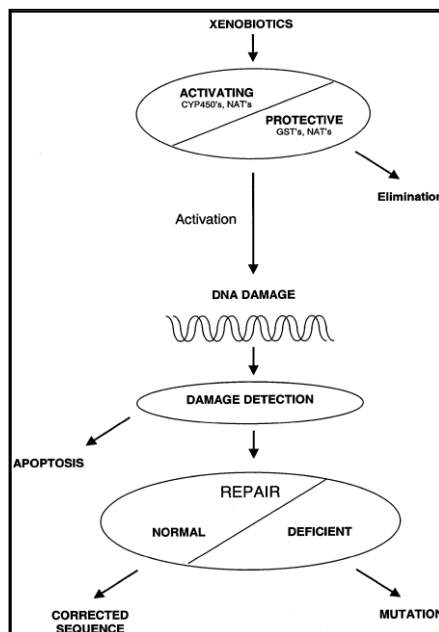
Los solventes orgánicos son hidrocarburos volátiles de bajo punto de ebullición derivados del petróleo y de gas. Estos hidrocarburos son clasificados según su uso como: a) solventes activos, los cuales desempeñan la función de disolver sustancias no hidrosolubles; b) como cosolventes y solventes latentes que sirven para realzar la capacidad de las resinas y c) como catalizadores de secado y como diluyentes los cuales se aprovechan para bajar los costos de los productos tales como las pinturas (Niño y Camargo, 1999). Ahora bien, las pinturas están constituidas por dos partes principales: la parte pigmentaria que consta de materiales sólidos de origen natural o sintético, estos pueden ser activos (que dan color y cubrimiento) o inactivos (que sirven como relleno), y el vehículo (parte líquida). El vehículo es la parte que contiene las principales mezclas de compuestos químicos orgánicos; el vehículo está formado por una sustancia formadora de película que puede ser un aceite, una resina, un polímero, etc., la cual sirve para formar una capa uniforme y sólida al secar, también contiene disolventes que son sustancias muy volátiles que modifican la viscosidad formando agregados moleculares de baja viscosidad con los aceites y las resinas; otro de los componentes son los adelgazadores que son lubricantes moleculares, y finalmente los agentes modificadores o aditivos, dentro de estos hay una gran variedad de sustancias que confieren diferentes propiedades a las pinturas aumentando de manera considerable las sustancias volátiles que conforman una pintura (Niño y Camargo, 1999). Dentro de toda esta gama de compuestos constituyentes de la pinturas se debe agregar una carga adicional de solventes orgánicos que intervienen en todo el proceso de preparación para su uso.

6.2. DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR QUÍMICOS (SOLVENTES ORGÁNICOS)

Es de anotar que las propiedades químicas únicas de los solventes orgánicos son capaces de facilitar tanto el ingreso al cuerpo como la interacción de los solventes o sus metabolitos con macromoléculas, presentando efectos nocivos para la salud en algunas personas, entre ellos efectos provocados por la acumulación y/o por la activación metabólica de las sustancias en el organismo (Peña *et al.*, 2001). Así estas sustancias activas pueden interactuar con el ADN y en el peor de los casos provocar desordenes genéticos que lleven a la producción de cáncer.

El daño inducido por agentes químicos consta de varios pasos, primero el compuesto xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye, y es capaz de ingresar a las células; ahí, el agente químico puede ser activo directamente, o bien puede ser activado por el metabolismo (Peña *et al.*, 2001), es decir, que el químico es de acción indirecta. Los compuestos intermedios del químico activados por la vía del citocromo P450 resultan muy electrofílicos, en su extremo terminal, tales compuestos son muy propensos a interactuar con los centros nucleofílicos presentes en moléculas como el ADN específicamente en “puntos calientes” como el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina. La lesión primaria generada por estos compuestos puede ser detectada, y si es muy agresiva puede generar apoptosis, pero si no lo es puede ser sometida a los sistemas de reparación, dentro de los cuales se puede dar una reparación eficiente o no (Ver Figura 1).

Figura 1. Esquema del ingreso y metabolismo de una sustancia exógena. Si la sustancia exógena no es eliminada o detoxificada induce daños en el ADN, donde la última línea de protección es la reparación.



Tomado de: MILLER *et al.* Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. 2001

6.3 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A MUTÁGENOS PARA EVALUAR EFICIENCIA DE REPARACIÓN

La prueba de sensibilidad a mutágenos permite identificar problemas de reparación del ADN (Hsu *et al.*, 1981; Au *et al.*, 1994; Parshad *et al.*, 1985). Partieron de la premisa de que pacientes con cáncer, e individuos propensos al cáncer tenían un tipo de defecto en la reparación del ADN lo que los hacía expresar una sensibilidad a químicos clastogénicos. Para la identificación de este defecto propusieron emplear métodos citogenéticos, inicialmente con el empleo de la prueba de alteraciones cromosómicas, pretendieron hacer una comparación entre las alteraciones cromosómicas de células sin tratamiento y las alteraciones cromosómicas inducidas en un cultivo de linfocitos. Indujeron lesiones en el ADN y proteínas (en los cultivos), con la aplicación de agentes químicos (bleomicina) o agentes físicos (rayos UV, gamma, etc.) de conocido efecto mutagénico. Las lesiones producidas entrarían en un proceso de reparación en el transcurso del ciclo celular, de ser reparadas los individuos serían no sensibles y expresarían un número similar de alteraciones cromosómicas de células sin tratamiento, de lo contrario las lesiones generarían alteraciones cromosómicas y los individuos serían sensibles, es decir, expresarían defectos en los sistemas de reparación y las alteraciones cromosómicas inducidas sobrepasarían las alteraciones cromosómicas de células sin tratamiento. La identificación de individuos más o menos sensibles se realizó en base al mayor o menor número de rupturas cromosómicas encontradas por célula. Es de aclarar que el concepto base de la prueba de sensibilidad a mutágenos es tan versátil que no solo se puede utilizar la prueba de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica, sino también con la prueba de micronúcleos, intercambio de cromátides hermanas, cometa, entre otras (Laffon, *et al.*, 2004).

El principio biológico de la prueba de sensibilidad a mutágenos consiste en evaluar la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN de una población de individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas Vs. una población de individuos de referencia (no expuestos) en cultivos celulares de sangre periférica; para ello se induce lesiones en el ADN por medio de un mutágeno (mitomicina C) *in vitro*, y posteriormente se registra el número de alteraciones cromosómicas (AC biomarcador) resultado de lesiones no reparadas. Durante el registro de AC se registrarán también las AC producto de lesiones causadas por diferentes factores (estrés oxidativo, alimentación, estilo de vida, etc), entonces, para asegurar que las AC tomadas en cuenta sean solo las AC producto de la inducción de lesiones por mitomicina C (eficiencia de reparación) se hace una evaluación paralela del número de AC de cultivos celulares sin tratamiento con MMC, así se podrá evaluar la eficiencia de reparación de lesiones discriminando la carga de AC que no fueron producidas por la MMC. Se espera que los individuos que reparan menos eficientemente las lesiones inducidas por el mutágeno presenten un mayor número de AC, y que los individuos que reparan más eficientemente las lesiones inducidas por el mutágeno presenten un menor número de AC.

Es claro que la prueba de sensibilidad a mutágenos evalúa la respuesta celular al daño en el ADN cuando hay exposición ambiental/ocupacional y la susceptibilidad individual, y que sus resultados pueden ser utilizados para predecir el riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer (Hsu, *et al.* 1989; Au, 2003). La prueba de sensibilidad a mutágenos se ha usado principalmente en la evaluación de 2 tipos de poblaciones, la primera en pacientes con cáncer para identificar si ellos presentaban o no sensibilidad a mutágenos, en donde se encontró que dentro de los pacientes con cáncer habían más individuos más sensibles a mutágenos. En 75 pacientes con cáncer aerodigestivo (no tratados), y 62 controles sanos, a quienes se les realizó la prueba de sensibilidad a mutágenos con, el 45% de los pacientes y el 13% de los controles fueron sensibles (Spitz, *et al.*, 1989), esta relación también se hizo evidente en pacientes con cáncer de pulmón (Spitz *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2003), con cáncer de cuello y cabeza (Cloos *et al.*, 1999) y otros (Wei., *et al.*, 2005). La evaluación de pacientes con cáncer representa la base de la evaluación del segundo tipo de poblaciones; las poblaciones expuestas a mutágenos ambientales. Dentro de estas poblaciones se han evaluado diferentes tipos de agentes, entre los cuales se pueden distinguir el butadieno, mezclas de pesticidas, benceno, uranio, entre otros (Hallberg, *et al.*, 1997; Au, *et al.*, 1995; Au, *et al.*, 1999; Hallberg, *et al.*, 1996),

Para este estudio se usó un químico radiomimético conocido como mitomicina C, el cual es un agente alquilante reconocido y empleado en la quimioterapia. La mitomicina C pertenece a la familia de las aziridina, producto natural proveniente de *Streptomyces lavendulae*, un actinomiceto. Usualmente es usada por vía intravenosa para el tratamiento de cáncer gastrointestinal, cáncer de colón, y también es aplicado a nivel tópico para el cáncer de córnea y superficialmente en tumores de vejiga (Mao, *et al.*, 1999)

6.4 POLIMORFISMO GENÉTICO

El polimorfismo genético (frecuencia es mayor del 1% en la población) se define, como una de las formas que puede tener un gen, como resultado de una variación como la sustitución de nucleótidos, delección, inserción o duplicación de una secuencia. Muchos polimorfismos pueden ocurrir en intrones o en regiones que no intervienen en el buen funcionamiento del genoma, sin embargo, algunos de ellos pueden ocurrir en exones y en regiones donde su alteración provoca cambios en la actividad proteínica (Wormhoudt, *et al.*, 1999), estos cambios de actividad, pueden ser favorables o desfavorables.

Un ejemplo claro de delección es el caso del gen de la Glutation S-transferasa (GST), que al no estar presente no hay una actividad enzimática. También se pueden dar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que si bien en este no se delecta la totalidad del gen, el polimorfismo puede presentarse en regiones que determinan cambios en dominios de interacción proteica, alterando la funcionalidad de la proteína. El problema de los polimorfismos es que muchos de ellos se presentan en secuencias que determinan procesos de regulación celular, como la reparación (Sanz, 2002).

6.5 REPARACIÓN DEL ADN

La reparación del ADN es un mecanismo esencial en la vida celular, ya que confiere a la células protección ante daños genotóxicos, consecuentemente la reducción en la capacidad de reparación provoca una alta sensibilidad individual desencadenando eventos que conlleven a la generación de problemas de salud. Por estos motivos se ha hecho énfasis en el uso de biomarcadores que puedan detectar deficiencias en la reparación del ADN y la sensibilidad a mutágenos en poblaciones humanas como un indicador de susceptibilidad a la enfermedad (Au *et al.*, 2001).

Como forma de defensa ante el inminente ataque de compuestos endógenos y exógenos, las células poseen diferentes sistemas de reparación para las diferentes lesiones en el ADN. Dentro del sistema de reparación se verifica que el ADN se encuentre en buen estado y se previene la pérdida o posible transcripción errónea de las cadenas de AND defectuosas, para esto existen varios sistemas de reparación, el uso de ellos depende del tipo de daño entre ellos se encuentran la reparación por escisión de base (BER) la cual repara lesiones causadas por especies reactivas de oxígeno, agentes alquilantes, además de sitios AP; la reparación por escisión de nucleótido (NER), repara aductos grandes como los producidos por inducción de fotolesiones con luz UV, reparación de bases mal apareadas (MMR), como su nombre lo dice repara bases mal apareadas causadas por desaminación de bases, oxidación, metilación y errores en la replicación y finalmente la reparación recombinacional, repara quiebres de cadena doble (Miller *et al.*, 2001; Christmann, *et al.*, 2003). La deficiencia en la reparación proporcionará un estado de posible mutación, ya que la reparación es la última etapa que tiene la célula para mantener la integridad del genoma ante el ataque de un compuesto exógeno.

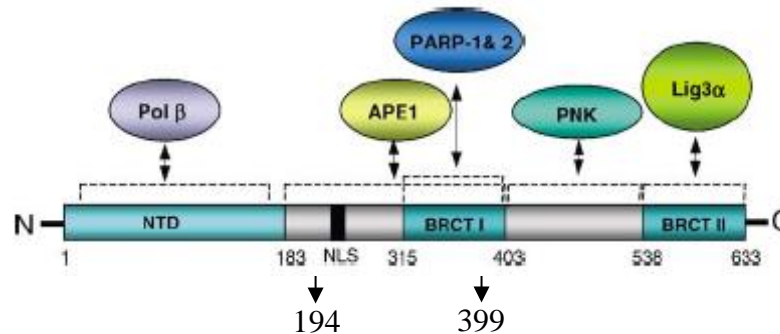
La reparación por escisión de base (BER) puede repara lesiones causadas bien sean por agentes de origen endógeno o exógeno. Durante el proceso de BER en primera instancia hay un reconocimiento de la base dañada, una remoción de la base y un corte del sitio AP con la enzimas glicosilasas, a continuación se inserta el nucleótido dañado y se decide por el camino de parche largo o parche corto, el nucleótido dañado es sintetizado y es incorporado nuevamente en el genoma por medio del complejo de la ligasa I o III, en este caso la ligasa interactúa con la proteína XRCC1, polimerasa beta y la PARP-1, hasta obtener nuevamente la cadena integra (Christmann, *et al.*, 2003).

6.6. GEN DE REPARACIÓN XRCC1 Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS

6.6.1. Gen XRCC1. El gen XRCC1 se encuentra en la posición 19q 13.2-13.3 (Thompson *et al.* 1989; Mohrenweiser, *et al.*, 1989). El estudio del gen XRCC1 inicio con la capacidad que se le atribuyó para restaurar la reparación del ADN, estudiado en células mutadas EM-9 y EM-11 de ovario de hamster chino las cuales presentaban hipersensibilidad a agentes alquilantes (Caldecott *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1990; Zdzienicka, *et al.*, 1992). Estudios *In vivo* demuestran que la ausencia del gen XRCC1 es capaz de provocar letalidad

embrionaria en ratones (Rayjean *et al.*, 2005), remarcando la necesidad de este gen en el organismo para su correcto funcionamiento. El gen XRCC1 es una secuencia que codifica para una proteína multidominio que interactúa con poly(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), la ADN polimerasa B, ADN ligasa III (Caldecott *et al.*, 1994, 1996, 2003), polinucleótido kinasa (PNK) (Whitehouse, *et al.*, 2001), y AP endonucleasa 1 (APE1) (Vidal, *et al.*, 2001), todas estas enzimas que actúan en la reparación por escisión de bases (BER) (Ver Figura 2). El dominio BRCT I del gen XRCC1 es un determinante crítico para la supervivencia celular, ante la exposición a especies reactivas de oxígeno, radiaciones ionizantes y agentes alquilantes (Caldecott, 2003; Thompson *et al.* 1990; Siciliano, *et al.* 1986).

Figura 2. Proteína XRCC1 y su interacción con enzimas que participan en el proceso de Reparación por Escisión de Bases (BER). NTD: Dominio N-Terminal; NLS: Señal de localización nucleolar; BRCT: Carboxilo terminal BRCA. Las líneas punteadas muestran los dominios donde ocurren las interacciones.



Tomado de: Caldecott, 2003.

6.6.2. Polimorfismo del gen XRCC1. Shen *et al.*, (1998) identificó tres polimorfismos en el gen XRCC1, en el exón 6 codón 194 posición 26304 C→T (cambio de Arginina por triptofano), en el exón 10 codón 399 posición 28152 G→A (cambio Arginina por glutamina) y en codón 280 posición 27466 G→A (cambio de Arginina por histidina). La importancia del análisis de los polimorfismos del gen XRCC1 para el codón 194(C→T) y 399(G→A) radica en que la variación de estos alelos modifican los dominios de unión proteína-proteína, consecuentemente la afinidad de acople con moléculas que intervienen en la reparación por escisión de bases (BER) alterando la capacidad de reparación. El polimorfismo del codón 194 y 280 se localiza al lado de dos secuencias mediadoras de las interacciones proteína-proteína con la Poly (ADP ribosa) polimerasa (PARP) y la polimerasa beta (Thompson, *et al.*, 2000) y el polimorfismo del codón 399 está en el dominio mediador de la interacción entre XRCC1 y PARP (Tuimala, *et al.*, 2002).

Los primers más usados para la amplificación del codón 194 y 399 del gen XRCC1 son: 194F5'- GCC CG TCC CAG GTA AGC -3' , 194R 5'- AGC CCC AAG ACC CTT TCA CT -3' y 399F 5'- TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA - 3' , 399R 5'- TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA -3' que generan los fragmentos 491pb y 615pb (Lunn, *et al.*, 1999; Tuimala, *et al.*, 2002), (Figura 3). Y para la identificación de los polimorfismos por RFLPs es usada la enzima MspI (Figura 4).

Figura 3. Patrón de bandas del producto de amplificación para PCR multiplex. Las bandas de 615pb y 419pb corresponden al exón 10 (posición 399) y al exón 6 (posición 194), respectivamente.

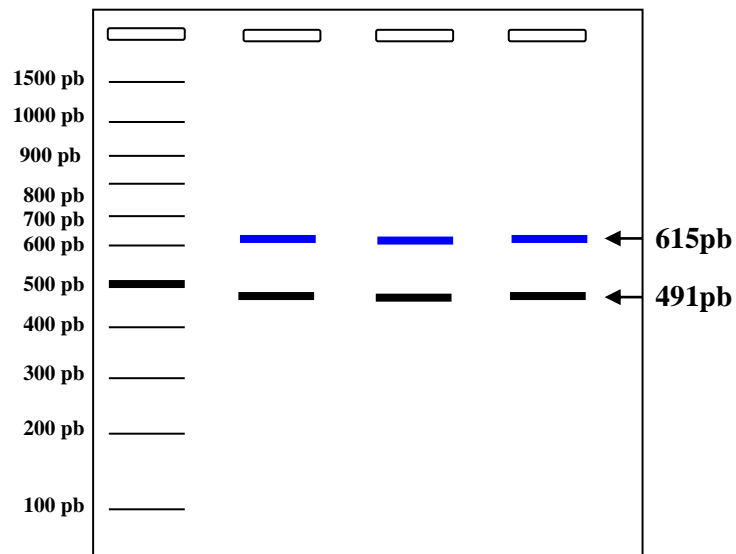
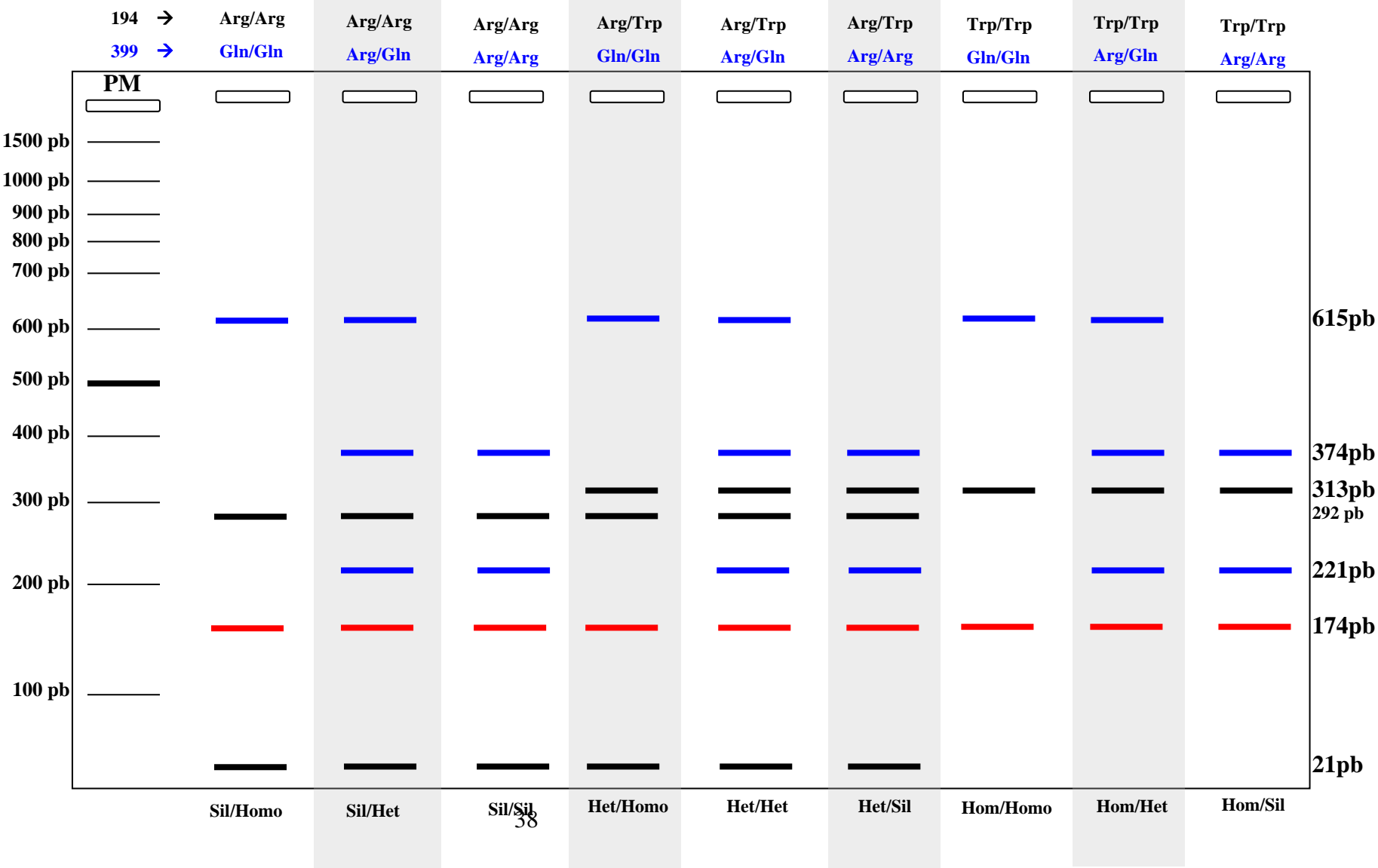


Figura 4. Diagrama del patrón de bandas para la digestión de los productos de amplificado del gen XRCC1 codones 194 y 399; contiene las posibles combinaciones de bandas.



6.8. BIOMARCADORES, EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y MONITOREO DE POBLACIONES.

La epidemiología estudia la distribución y determinantes de enfermedades en poblaciones humanas. Esta ciencia ha evolucionado para determinar modelos que permitan un mejor estudio de poblaciones, entre estos se ha hecho especial énfasis en los monitoreos biológicos. Hoyos (2000) afirma que es prioritaria la realización de estudios de monitoreo biológico en poblaciones expuestas empleando como herramienta la epidemiología molecular que permitan identificar los efectos de exposición a mutágenos y predecir los potenciales riesgos de salud. Estos estudios se remiten esencialmente al uso de biomarcadores.

Un biomarcador es un evento cuya presencia es indicadora de toxicidad en el organismo usando en lo posible técnicas no invasivas (Collins, 1998). Existen 3 tipos de biomarcadores ellos son: Los biomarcadores de exposición (BEx) indican la exposición a un compuesto midiendo el compuesto o sus metabolitos en diferentes tipos de tejidos. Los trabajos realizados con este biomarcador han sido principalmente en torno a los compuestos químicos genotóxicos, basados en que el potencial carcinogénico o mutagénico de sustancias químicas electrofílicas está proporcionalmente relacionado con sus interacciones covalentes con el ADN lo cual se determina con mediciones de aductos (Peri, 2001), Biomarcadores de efecto (BE) los cuales miden sustancias endógenas o parámetros que indican cambios biológicos como respuesta a sustancias químicas externas que logran ingresar al organismo. Los biomarcadores de efecto varían desde medidas como por ejemplo el peso del cuerpo hasta las respuestas moleculares que pueden ser desde daños en el material genético (ADN), inducciones enzimáticas, inmunosupresión entre otras, uno de los más reconocidos biomarcadores de efecto son las alteraciones cromosómicas. Finalmente los biomarcadores de susceptibilidad (BS) que incluyen factores genéticos y cambios en los receptores los cuales alteran la susceptibilidad de un organismo ante la exposición de una sustancia química. Los biomarcadores de susceptibilidad muestran una sensibilidad anormal elevada de los efectos de la exposición ambiental en un organismo (Groopman *et al.*, 1995).

El análisis genotípico (BS) combinado con otro tipo de biomarcador es una de las estrategias más usadas para los biomonitoreos. En algunos estudios se han combinado genes del metabolismo (BS), ensayo cometa (BEx) y Alteraciones cromosómicas (BE) (Kocabas, *et al.*, 2000), también la asociación entre genes de reparación (BS), Intercambio de cromátides hermanas (BE) y aductos de ADN (BEx) (Duell, *et al.*, 2000), genes de reparación (BS) y alteraciones cromosómicas (BE) (Harms, *et al.*, 2004) entre muchos otros. Este tipo de combinaciones permiten un mejor análisis de la situación real, y por ende una mejor predicción de posibles riesgos.

7. METODOLOGÍA

7.1. TIPO DE ESTUDIO

Este estudio de biomonitorio epidemiológico molecular, tipo *Cross-sectional* (Blair *et al.*, 1999); empleó una población saludable ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos y pinturas y una población de referencia ocupacionalmente no expuesta a estas sustancias.

7.2. SELECCIÓN DE VARIABLES

Tabla 2. Variables relacionadas en el estudio

FACTORES	Tipo de variable	Naturaleza	Escala de medición	Niveles	Estadística de resumen
Exposición	Independiente	Cualitativa	Nominal	1. Individuos de referencia 2. Expuesto	
Tiempo de exposición	Independiente	Cuantitativa	Razón	Años de trabajo	Todas las existentes
Edad	Independiente	Cuantitativa	Razón	Años	Todas las existentes
Genotipos del gen XRCC1	Independiente	Cualitativa	Nominal	Codones: *194 / 399 1. Arg/Arg / Arg/Arg 2. Arg/Arg / Arg/Gln 3. Arg/Arg / Gln/Gln 4. Arg/Trp / Arg/Arg 5. Arg/Trp / Arg/Gln 6. Arg/Trp / Gln/Gln 7. Trp/Trp / Arg/Arg 8. Trp/Trp / Arg/Gln 9. Trp/Trp / Gln/Gln	Conteo de porcentaje, frecuencia relativa
Frecuencia de Alteraciones Cromosómicas inducidas por MMC	Dependiente	Cuantitativa	Razón	1. Alteración cromatídica 2. Alteración cromosómica	Todas las existentes

*Nucleótido para alelo silvestre 194: Arg 399: Arg
Nucleótido para alelo Polimórfico 194: Trp 399: Gln

7.3 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE MUESTRA

La población objeto de estudio fue una población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas. La población total objeto de estudio incluyó 100 individuos, 50 expuestos a solventes orgánicos y pinturas y 50 individuos de referencia (no expuestos). Los individuos de los grupos expuesto y de referencia fueron saludables, y se controlaron los factores de confusión como, el hábito de fumar, entre otras.

7.4. SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En primera instancia se informó y motivó sobre el estudio a los individuos potenciales objeto de estudio en palabras claras y veraces, una vez motivados y luego de aceptar participar voluntariamente en el estudio, se les aplicó una encuesta corta preliminar (Anexo A), con objeto de obtener información personal para su preselección, teniendo presente los criterios de inclusión y exclusión. Una vez preseleccionadas las personas, se les hizo una encuesta larga (Anexo B), para obtener una información más completa con datos más precisos del estilo de vida, datos familiares y datos de exposición, los cuales son estrictamente confidenciales. Una vez encuestados, a los individuos se les dio un código, con el cual se trataron en adelante, para asegurar confidencialidad de los datos además de evitar posibles sesgos.

7.4.1. Criterios de selección y exclusión Para la selección de individuos que participaron en el estudio tanto para el grupo expuesto como para el grupo de individuos de referencia, se tuvieron en cuenta los siguiente parámetros de selección: el no consumo de cigarrillo, no consumo de drogas psicoactivas, no haber tenido enfermedades virales recientes, ni irradiaciones recientes, no haber estado expuestos por un periodo prolongado a compuestos tales como plaguicidas, o metales pesados en trabajos anteriores y finalmente que todos los individuos sean hombres.

7.4.2. Selección del grupo expuesto Se tomó una población de personas que se dedican al oficio de pintura de automóviles, que tuvieran un mínimo de 5 años de exposición, y principalmente que quisieran participar en el estudio, es decir que su participación fue voluntaria.

7.4.3. Selección del grupo de individuos de referencia (no expuestos) Para la selección de las personas del grupo de individuos de referencia se tuvo en cuenta los mismos criterios de inclusión y de exclusión del grupo expuesto; además, los individuos no estuvieron anteriormente expuestos por largos periodos a solventes orgánicos y pinturas; los individuos de este grupo fueron elegidos buscando un emparejamiento por edad con respecto al grupo de individuos expuestos a los solventes orgánicos.

7.4.4. Consentimiento informado Una vez seleccionados los individuos objeto de estudio, después de haber sido informados de los objetivos, propósito, metodología, riesgos y beneficios del estudio y la aplicación de las correspondientes encuestas tanto a los integrantes del grupo expuesto como del grupo de individuos de referencia se les entregó un consentimiento informado (Anexo C) avalado por el Comité de Ética de la Universidad del Cauca donde se les explicó todas las implicaciones acerca de la participación en el proyecto y los beneficios que obtendrán los participantes. Una vez leído este, los participantes firmaron y afirmaron su deseo voluntario de participar en el estudio.

7.4.5. Obtención y procesamiento de la información La información recolectada en las encuestas se introdujo en tablas maestras para su posterior manejo, análisis y fácil ubicación de los individuos para la toma de muestras de sangre, esta información se procesó con el programa Excel.

7.5. TOMA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Una vez llenados los requisitos de las encuestas y firmado el consentimiento informado, se procedió con la toma de las muestras de sangre, la cual fue realizada por una enfermera titulada que garantizó el correcto desempeño del procedimiento. Las muestras de sangre se tomaron con vacuntainers estériles, uno con el anticoagulante heparina, para la realización del cultivo celular para la prueba de sensibilidad a mutágenos (3 mL), y el otro con el anticoagulante EDTA para la extracción de ADN (12 mL). Una vez extraída la sangre, se llevó al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para los correspondientes procedimientos que se llevaron a cabo según el manual de citogenética de Hoyos *et al.*, (2002).

7.6. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A MUTÁGENOS PARA EVALUAR EFICIENCIA EN LA REPARACIÓN

7.6.1. Cultivos celulares y tratamientos con Mitomicina C. Los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en la cámara de flujo laminar, se comenzó con la siembra de linfocitos para inducir la proliferación celular, a cada individuo se le estableció un cultivo con su respectivo duplicado. La siembra se realizó en tubos Falcon de 15 mL, cada cultivo con un total de 5 mL los cuales contenían medio RPMI 1640 suplementado con antibiótico Pen-Strep al 1% (para prevenir el desarrollo de microorganismos contaminantes), l-glutamina al 1%, fitohemaglutinina al 2%, y sangre del paciente en una concentración del 10 %, los cultivos celulares fueron incubados a 37°C por un periodo de 72 horas. El tratamiento se realizó en la fase G2 luego de haber transcurrido 67 horas de incubación, los cultivos fueron tratados con Mitomicina C (Químico mutagénico conocido) en una concentración final para cada cultivo de 0.25mM. Luego los cultivos nuevamente

fueron incubados a 37° C por 5 horas más. De igual manera se establecieron cultivos paralelamente para evaluar alteraciones cromosómicas en los individuos expuestos y de referencia sin haber sido tratados con MMC.

7.6.2. Cosecha celular. Dos horas y media antes de la cosecha (69,5 horas), se aplicó a cada cultivo 0,1mL de colcemid, para detener las células en metafase. Al terminar la incubación los cultivos celulares se sometieron a centrifugación entre 800 a 1000 rpm. por 5 a 7 minutos (todas las centrifugaciones se realizarán en iguales condiciones), se removió el sobrenadante y se agregó 6 mL de la solución hipotónica (0.075M KCl) se incubó a 37° C por 30 min. A continuación se fijó con 1mL de fijador Carnoy's (etanol – Ácido Acético 3:1) y se centrifugó nuevamente. Se removió el sobrenadante y se fijó con 5 mL de fijador Carnoy's, una vez hecho esto se dejó la suspensión celular por 20 min. en refrigeración; transcurrido este tiempo se centrifugó y se fijó 2 veces más, sin refrigeración. Una vez terminada la fijación se tomó el botón celular y se agregó una pequeña cantidad de fijador fresco (0,5mL aprox.).

7.6.3. Montaje de las preparaciones citogenéticas, tinción, observación y registro. Se tomaron portaobjetos (placas) limpios y se dejaron en ácido acético al 60% refrigerados, sobre ellos se goteó la suspensión celular con pipeta desde una altura aproximada de 1m. para obtener los extendidos celulares, se obtuvieron un total de 4 placas por paciente, 2 placas por tubo de cultivo. Se dejaron secar las placas por una noche y se tiñeron con solución de Giemsa al 6% por 5 a 7 min. Una vez teñidas las placas se le hizo un doble ciego el cual consiste en una codificación secundaria (hecha por otra persona) que impidió la observación del código principal, de tal manera al observar las placas al microscopio no se supo si la placa pertenecía a un individuo expuesto o a un individuo del grupo de individuos de referencia. Durante la observación de las placas en el microscopio se registró 50 células en metafase por paciente (Tabla 2), registrando las alteraciones cromosómicas (Rupturas como alteraciones de tipo cromatídico, de tipo cromosómico, dicéntricos, rearrreglos, etc.) encontradas en cada una de ellas (de haberlas).

Tabla 3. Resumen de diseño experimental para la prueba de sensibilidad a mutágenos.

Grupo	Nº de individuos	Nº cultivos por individuo	Total cultivos por grupo	Nº de placas por cultivo	Total placas por cultivo	Nº de células metafásicas registradas	Total células metafásicas registradas
Referencia	50	2	100	2	200	50*	10.000
Expuesto	50	2	100	2	200	50*	10.000
Total	100		200		400		20.000

* Todas las células registradas contaron con 46 cromosomas

7.7. GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN XRCC1 POR PCR-RFLPs

La genotipificación del gen de reparación XRCC1 es objeto de estudio en el macroproyecto “Asociación de Alteraciones Cromosómicas, Polimorfismo Genéticos y Potenciales Riesgos de Salud por la Exposición Ocupacional a Solventes Orgánicos” financiado por Colciencias ID 1898 2006 (Hoyos, *et al.*, 2006). Los datos de genotipificación obtenidos en el estudio anteriormente mencionado fueron empleados para este estudio, cabe resaltar, que el procedimiento de la estandarización y genotipificación de los individuos fue realizado por quien presenta este proyecto.

7.7.1. Aislamiento de linfocitos por el método de Ficoll-Histopaque. (Histopaque®-1077 Sigma - Aldrich) En un tubo de 15mL se tomó 5mL de histopaque (gradiente de densidad), se agregó sangre total en cantidad igual (5mL), procurando mantener dos fases, una de histopaque y otra de sangre. Se centrifugó a 2600rpm por 30min, al cabo de este tiempo se observaron 4 fases una de plasma, una de linfocitos, una de histopaque y otra de eritrocitos, en orden descendente, de las cuales se retiró la capa de linfocitos; estos linfocitos se transfirieron a un tubo nuevo y se lavaron con de PBS (buffer fosfato salino), se centrifugó a 1200rpm por 12min, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado.

7.7.2. Extracción de ADN por el Kit de Quiagen. (QIAamp® DNA Mini Kit) El aislamiento de ADN se realizó por medio del kit de Quiagen con los linfocitos ya extraídos se comenzó por adicionar 20µL de proteasa y 200µL de buffer de lisis al pelet de linfocitos, una vez hecho esto se incubó a 70° C por un periodo de una hora, una vez transcurrido este tiempo se agregó 200µL de etanol absoluto, y se transfirió la muestra a una columna que consta de un filtro, y un tubo contenedor (incluida en el kit) se centrifugó a 10.000rpm por 3min; en este paso el ADN quedó contenido en el filtro de la columna. Se hicieron 2 lavados, uno agregando 500µL de buffer AW1 con una subsecuente centrifugación a 10.000rpm por 2min, y otra con 500µL de buffer AW2 centrifugando a 14.000rpm por 3min, finalmente se agregó el buffer de elución (AE) el cual hizo desprender el ADN del filtro, a continuación se centrifugó a 8.000rpm por 2min y se pasó el líquido del tubo contenedor (con el ADN) a tubos estériles para su criopreservación.

7.7.3. Condiciones de amplificación (PCR). Para la genotipificación de los exones 10 (posición 399) y 6 (posición 194) del gen XRCC1, se realizó PCR multiplex para la amplificación empleando los siguientes primers: 194F5' - GCC CG TCC CAG GTA AGC - 3' , 194R 5' - AGC CCC AAG ACC CTT TCA CT -3' y 399F 5' - TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA - 3' , 399R 5' - TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA -3' que generaron los fragmentos 491pb y 615pb (Lunn, *et al.*, 1999; Tuimala, *et al.*, 2002), las condiciones del PCR se llevaron inicialmente a 5 minutos de desnaturalización a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30seg. a 94°C y 1min. a 62°C y 45seg. A 72°C. Se hizo una extensión final de 72°C por 5 min. (Abdel-Rahman, *et al.*, 2000a).

7.7.4. Polimorfismos genéticos (RFLPs). Después de la electroforesis para el chequeo de la amplificación de los fragmentos de interés se procedió con la digestión, la cual se realizó con la enzima MspI (Promega), por un periodo de 10 horas a 37°C, los productos digeridos se corrieron en electroforesis en gel de agarosa metaphor al 3% para identificar los patrones de bandas de los diferentes polimorfismos. Se hicieron repeticiones al azar de identificación de los polimorfismos a un 10% de las personas seleccionadas para confirmar la fiabilidad de los genotipos encontrados. Los datos obtenidos de los análisis de los diferentes polimorfismos se llevaron a tablas en las cuales se registraron los respectivos genotipos para su análisis. De igual manera, se llevó un registro fotográfico.

7.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Inicialmente se obtuvo la diferencia entre la frecuencia de AC totales (con tratamiento MMC), y las AC de células sin tratamiento MMC¹, (Ver figura 4), con el fin de determinar el número de AC inducidas *in vitro* por la MMC. Este dato se sometió a pruebas de normalidad (Shapiro Wilk: $p < 0,05$), y de homogeneidad de varianza (Levene: $p < 0,05$), usando el programa estadístico SPSS versión 14, y al no cumplir los datos con tales requerimientos, fueron analizados mediante pruebas no paramétricas del siguiente modo:

Figura 5. Origen del valor numérico de las Alteraciones cromosómicas inducidas.

$$\begin{array}{rcccl}
 \text{AC totales (con Tto.)} & - & \text{AC sin Tto.} & = & \text{AC inducidas} \\
 \text{(obtenidas de la prueba de} & & \text{(obtenidas de las} & & \text{por MMC} \\
 \text{sensibilidad a mutágenos} & & \text{células sin Tto.} & & \text{(Datos)} \\
 \text{con MMC)} & & \text{con MMC}^1) & &
 \end{array}$$

Las características demográficas fueron evaluadas con las pruebas de X^2 y exacto de Fisher. Para la relación entre grupo expuesto y de individuos de referencia con relación a las AC inducidas se realizó la prueba de Mann-Whitney con un nivel de significancia de 0,05. Para evaluar la asociación de la edad con la frecuencia de AC inducidas se realizó una prueba de correlación Rho de Spearman, al igual que para el tiempo de exposición. La prueba de Mann-Whitney fue empleada para la relación entre el Gen XRCC1 codón 194 en cuanto a las AC inducidas y la prueba de Kruskal- Wallis para la relación entre el codón 399 y las AC inducidas, y también para evaluar la relación entre la exposición y el gen XRCC1 codón 194 y 399 en cuanto a las AC inducidas.

¹ Macroyecto “Asociación de Alteraciones Cromosómicas, Polimorfismo Genéticos y Potenciales Riesgos de Salud por la Exposición Ocupacional a Solventes Orgánicos” financiado por Colciencias ID 1898 2006 (Hoyos *et al.*, 2006)

8. RESULTADOS

8.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

La tabla 3 muestra las características de la población, incluidas las genéticas, encontradas para los individuos. No se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos ($P > 0,05$), para dichas características. Las frecuencias poblacionales están representada por el número de individuos que poseen el genotipo especificado. En cuanto a la genotipificación del gen XRCC1 se encontró para el exón 194 la frecuencia más alta para el genotipo silvestre Arg/Arg tanto para los individuos de referencia como para expuestos (88% y 82% respectivamente), el genotipo homocigótico mutante Trp/Trp no fue detectado en los grupos, y el genotipo heterocigótico Arg/Trp tuvo una frecuencia baja (Individuos de referencia 12% y expuestos 18%). La frecuencia del alelo Trp se obtuvo a partir los individuos heterocigóticos, tomando la mitad de la frecuencia obtenida para este genotipo, de está manera se encontró una frecuencia del alelo Trp para la población total de 7,5%. Para el caso del exón 399 se encontró una similaridad de frecuencias para el genotipo homocigótico silvestre (Arg/Arg) (Individuos de referencia: 46%; Expuestos: 44%) y heterocigótico (Arg/Gln) (Individuos de referencia: 44%; Expuestos: 44%), representadas indistintamente del grupo al que pertenecieran; el genotipo homocigótico mutante se encontró en menor frecuencia (Individuos de referencia: 10%, Expuestos: 12%). En cuanto a la frecuencia alélica del alelo Gln se sumó el número de individuos homocigóticos para el alelo Gln y la mitad de la frecuencia de los individuos heterocigóticos, de esta forma la frecuencia para el alelo Gln para la población total fue de 33%.

8.2. EFICIENCIA DE REPARACIÓN DE LESIONES INDUCIDAS *In Vitro* CON MMC EN EL ADN ENTRE GRUPOS

En la tabla 4 se muestra el promedio de ACs inducidas *in vitro* por MMC encontradas para el grupo de referencia ($0,54 \pm 0,229$), y el grupo expuesto ($1,66 \pm 0,298$). Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para el promedio de las alteraciones de tipo cromatídico (A.ct) ($P = 0,01$) y para las AC totales ($P = 0,003$) entre los grupos, sin embargo, (Ver figura 6), para el promedio de alteraciones de tipo cromosómicos (A.cm) no se encontró diferencia significativa ($P = 0,097$).

Tabla 4. Características demográficas de la población.

Variable	Individuos de Referencia N (%)	Expuestos n (%)	Total n (%)	P
Sujetos	50	50	100	
Consumo de Medicamentos				
No	46 (92,0)	47 (94,0)	93(93,0)	0,500 ^a
Si	4 (8,0)	3 (6,0)	7 (7,0)	
Problemas de salud familiar				
No	44 (88,0)	45 (90,0)	89(89,0)	0,500 ^a
Si	6 (12,0)	5 (10,0)	11 (11,0)	
Edad (años)				
Media ± Error Estándar	36,08 ±1.345	35,46 ±1,326		0,878 ^c
Tiempo de exposición (años)				
Media ± Error Estándar	0 0,00 ±0,00	50 14,94± 2,5		
Genotipo XRCC1				
194				
Arg/Arg	44(88,0)	41(82,0)	85(85,0)	0,288 ^a
Arg/Trp	6(12,0)	9(18,0)	15(15,0)	
Frecuencia Trp	(6,0)	(9,0)	(7,5)	
399				
Arg/Arg	23(46,0)	22(44,0)	45(45,0)	0,900 ^b
Arg/Gln	22(44,0)	22(44,0)	44(44,0)	
Gln/Gln	5(10,0)	6(12,0)	11(11,0)	
Frecuencia Gln	(32,0)	(34,0)	(33,0)	

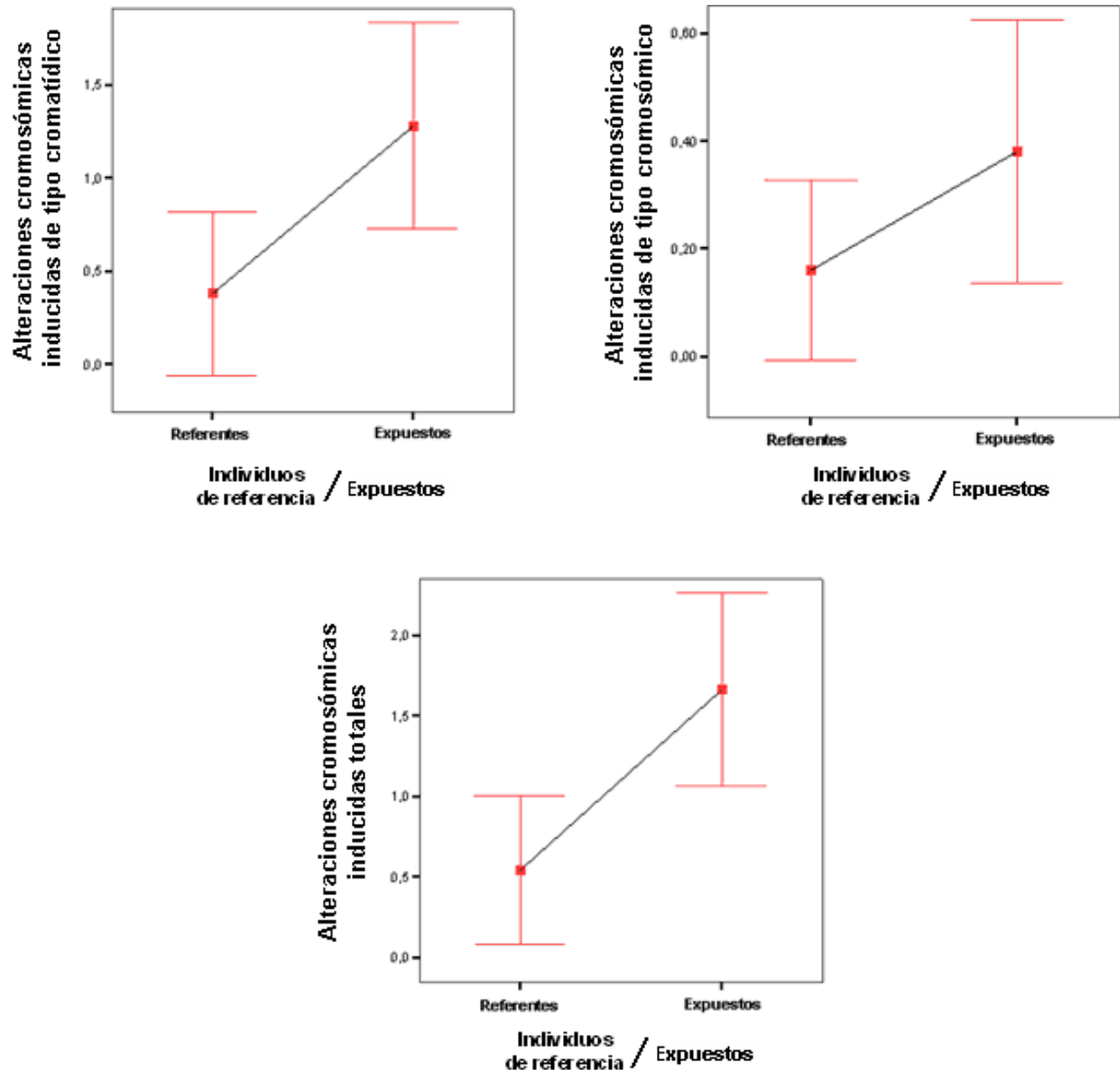
^a Estadístico Exacto de Fisher, ^b x² de Pearson bilateral, ^c Levene

Tabla 5. Relación entre el grupo de individuos de referencia y expuestos con respecto al promedio de alteraciones cromosómicas inducidas *in vitro* con MMC.

Grupo	\bar{X} Alteraciones de tipo cromatídico* ± EE	\bar{X} Alteraciones de tipo cromosómico* ± EE	Alteraciones Cromosómicas totales ± EE
Referencia (n= 50)	0,38±0,219	0,16±0,826	0,54±0,229
Expuestos (n= 50)	1,28±0,274	0,38±0,121	1,66±0,298
P	0,01 ^a	0,097 ^a	0.003 ^a

EE: Error estándar, ^a Prueba U de Mann-Whitney *Alteraciones promedio de n individuos. 50 células analizadas por individuo.

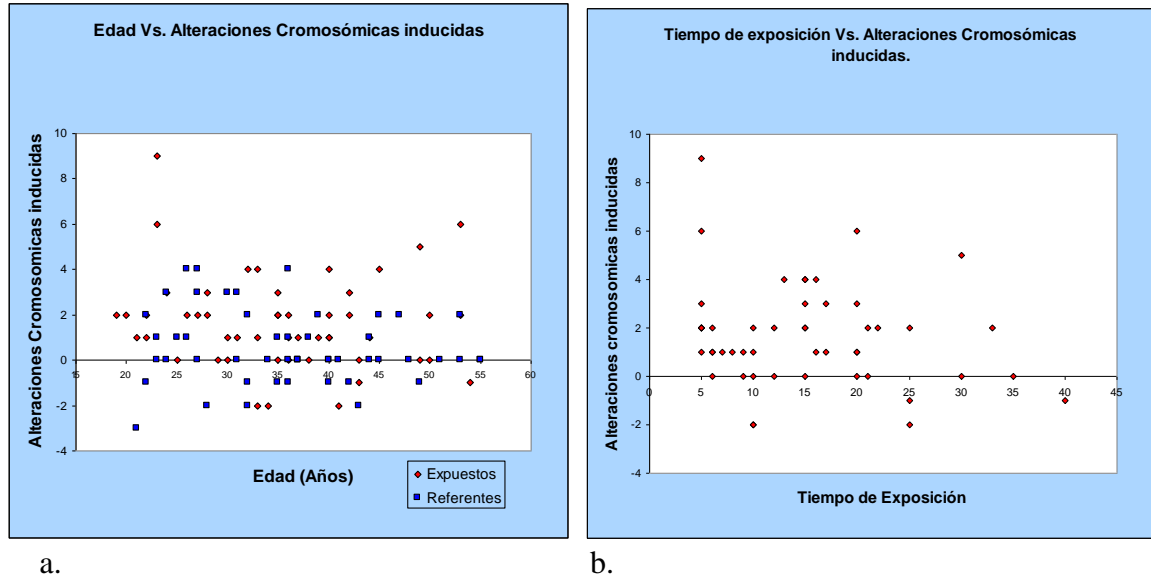
Figura 6. Relación entre el grupo de individuos de referencia y expuestos con respecto al promedio de alteraciones cromosómicas inducidas *In vitro* con MMC de tipo cromatídico, cromosómico y totales.



8.3. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS *In vitro* CON MMC.

No se halló asociación significativa estadísticamente entre la frecuencia total de AC inducidas con la edad ($Rho = -0.171$; $P = 0.09$), ni con el tiempo de exposición ($Rho = 0.162$; $P = 0.261$). La distribución fue aleatoria, por lo tanto la edad y el tiempo de exposición no fueron un factor de confusión para los resultados. (Figura 7).

Figura 7. Análisis de interacción entre la edad y el tiempo de exposición en cuanto a las alteraciones cromosómicas inducidas *In vitro* con MMC a. Edad Vs. alteraciones cromosómicas inducidas, b. Tiempo de exposición Vs. alteraciones cromosómicas inducidas.



8.4. MODULACION DEL GEN XRCC1 (CODÓN 194 Y 399) SOBRE LA FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS *In vitro* CON MMC.

En la tabla 5 se indican los promedios de alteraciones cromosómicas inducidas encontradas para cada genotipo del gen XRCC1 (codones 194 y 399). No se encontró una influencia de los polimorfismos de los codones 194 y 399 sobre las ACs inducidas de toda la población (194: $P = 0,810$; 399: $P = 0,631$).

8.5. RELACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN, EL GENOTIPO DEL GEN XRCC1 (CODÓN 194 Y 399), Y LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS *In vitro* CON MMC.

Mediante análisis de varianza factorial, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la exposición y el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 codón 194 en cuanto a las AC inducidas ($P = 0,009$), de la misma manera se encontró asociación estadísticamente significativa entre la exposición y el polimorfismo del gen de reparación XRCC1 codón 399 en cuanto a las AC inducidas ($P = 0,016$), (ver tabla 6 y figura 8).

Tabla 6. Alteraciones cromosómicas inducidas *In vitro* con MMC (Individuos de referencia y Expuestos) asociadas a los genotipos del gen XRCC1 codón 194 y 399.

	\bar{x} Alteraciones de tipo cromatídico* \pm EE	\bar{x} Alteraciones de tipo cromosómico* \pm EE	Alteraciones Cromosómicas totales \pm EE
Codón 194			
Arg/Arg (<i>n</i> = 85)	0,753+0,175	0,270+0,83	1,023+0,197
Arg/Trp (<i>n</i> = 15)	1,267+0,693	0,266+0,153	1,533+0,675
Trp/Trp (<i>n</i> = 0)	-	-	-
P	0,937 ^a	0,400 ^a	0,810 ^a
Codón 399			
Arg/Arg (<i>n</i> = 43)	0,820+0,228	0,380+0,132	1,200+0,267
Arg/Gln (<i>n</i> = 46)	0,840+0,330	0,180+0,088	1,020+0,342
Gln/Gln (<i>n</i> = 11)	0,820+0,352	0,180+0,182	1,00+0,357
P	0,833 ^b	0,781 ^b	0,631 ^b

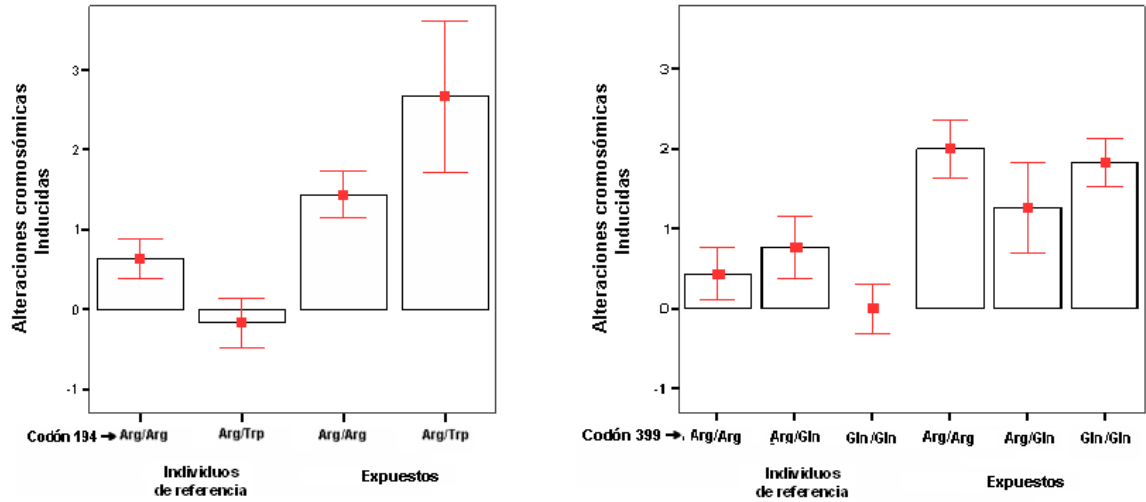
EE: Error estándar, ^a Prueba U de Mann-Whitney ^b Prueba de Kruskal-Wallis *Alteraciones promedio de *n* individuos. 50 células analizadas por individuo

Tabla 7. Alteraciones cromosómicas inducidas *In vitro* con MMC (AC), asociadas a la exposición (Individuos de referencia/expuestos) y al genotipo del gen XRCC1 codón 194 y 399.

Genotipo XRCC1	Individuos de Referencia	Expuesto	P
Codón 194			
Arg/Arg	0,640 + 0,254	1,444 + 0,294	0,009 ^a
Arg/Trp	-0,170 + 0,307	2,670 + 0,943	
Codón 399			
Arg/Arg	0,430 + 0,326	2,000 + 0,360	0,016 ^a
Arg/Gln	0,770 + 0,389	1,270 + 0,567	
Gln/Gln	0,000 + 0,316	1,830 + 0,307	

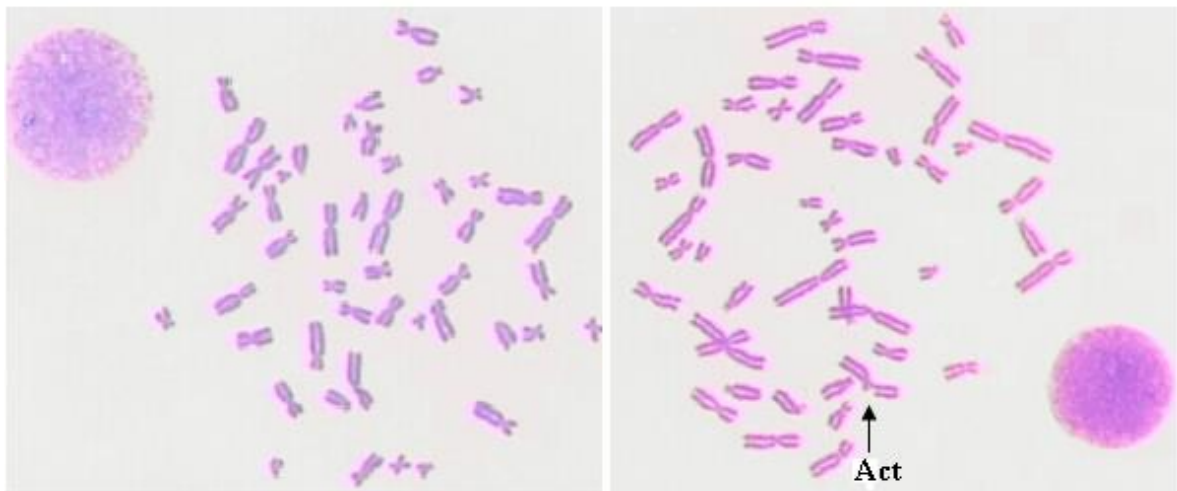
^aPrueba de Kruskal-Wallis

Figura 8. Alteraciones cromosómicas inducidas *In vitro* con MMC (AC), asociadas a la exposición (Individuos de referencias/Expuestos) y al genotipo del gen XRCC1 codón 194 y 399.



8.6. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LOS RESULTADOS

Figura 9. Metafasas de linfocitos de sangre periférica con 46 cromosomas a. Metafase normal b. 1 Alteración de tipo cromatídico (Act) c. 3 Alteración de tipo cromatídicos. d. 1 Alteración de tipo cromatídico y 1 Alteración de tipo cromosómico (Acm).



a.

b.

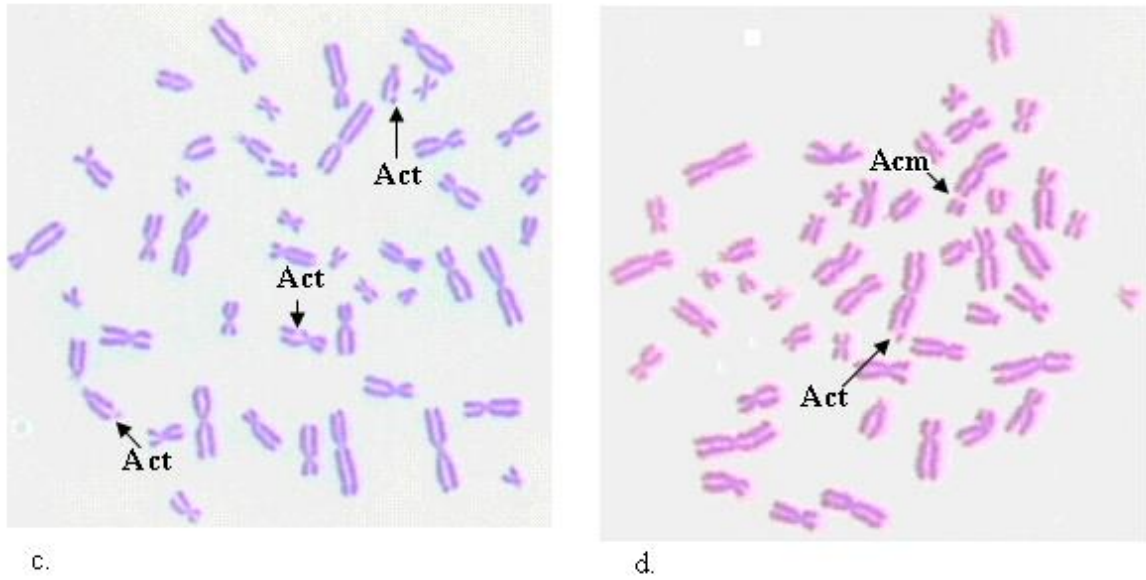
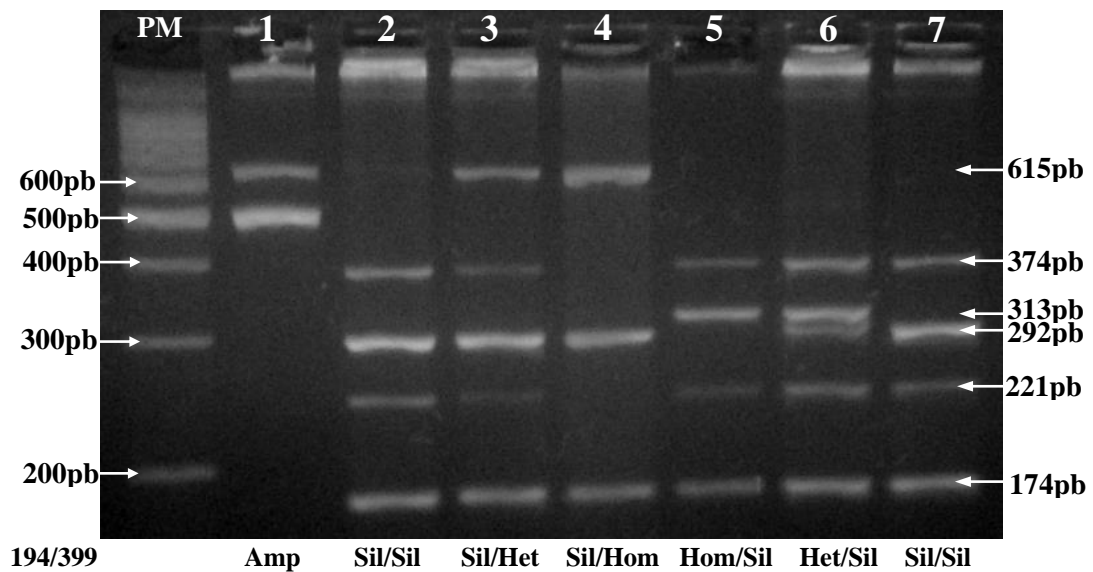


Figura 10. Patrón de bandas para la digestión del producto de amplificado del PCR multiplex para el gen XRCC1 codón 194 y 399. Carril 1: producto de amplificado (Amp.), las bandas corresponden a 615pb para el codón 399 y 491pb para el codón 194; Carril 2: las bandas corresponden al genotipo silvestre194 /silvestre 399; Carril 3: las bandas corresponden al genotipo silvestre194 /heterocigótico 399; Carril 4: las bandas corresponden al genotipo silvestre194 /homocigótico mutante 399; Carril 5: las bandas corresponden al genotipo homocigótico mutante 194 /silvestre 399; Carril6: las bandas corresponden al genotipo heterocigótico 194/silvestre 399; Carril7: las bandas corresponden al genotipo silvestre194/silvestre 399. Gel de agarosa al 3%.



9. DISCUSIÓN

Al evaluar las características demográficas de los grupos analizados (Individuos de referencia/expuestos) incluida la distribución de los genotipos del gen XRCC1 (codones 194 y 399) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) (Tabla 3), lo cual, permitió hacer análisis y comparaciones más certeras entre los grupos, además la homogeneidad para los grupos verificó el acertado emparejamiento por edad entre los individuos (50 individuos de referencia /50 expuestos). El número de individuos manejados (50 individuos de referencia /50 expuestos) que conformaron la muestra en este estudio estuvo acorde con estándares internacionales para la prueba de sensibilidad a mutágenos (SM) (Gu., *et al.*, 1999; Erdei, *et al.*, 2006; Lee, *et al.*, 1996). Ahora bien, teniendo en cuenta que factores como las irradiaciones con rayos x, el consumo de drogas y el consumo de cigarrillo reconocido por su influencia sobre la capacidad de reparación representado en una alta frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (AC) inducidas (Cebulska-Wasilewska, *et al.*, 2007; Affatato, *et al.*, 2004), pueden actuar como factores de confusión para la prueba de sensibilidad a mutágenos, estos factores fueron excluidos para evitar falsos positivos o falsos negativos.

Para la PCR y los RFLPs del gen XRCC1 se llevó a cabo una estandarización del PCR multiplex para los codones 194 y 399. Una vez genotipados todos los individuos se hicieron repeticiones de muestras en duda y de muestras al azar para verificar los genotipos. Este procedimiento se realizó según los parámetros descritos por Lunn *et al.*, (1999), Tuimala *et al.*, (2002) y Abdel-Rahman, *et al.*, (2000a). La distribución de los genotipos del gen XRCC1 codón 194 y 399 al igual que las otras características demográficas no fue significativa estadísticamente para la diferencia entre grupos (Arg194Trp $P = 0,288$ y Arg399Gln $P = 0,900$).

En la población total (Individuos de referencia /Expuestos) se encontró que el genotipo del gen XRCC1 presentó una frecuencia alélica de 0,075 para el alelo 194Trp y 0,33 para el alelo 399Gln. Las frecuencias de los alelos polimórficos varían según la población. La frecuencia encontrada para el alelo 194Trp es comparable con la encontrada por Lunn *et al.* (1999) en poblaciones negras (0.05 194Trp) y blancas (0.06 194Trp), y para el alelo 399Gln comparable con la población blanca (0.37 399Gln) y Taiwanesa (0.26 399Gln). Aunque Shen *et al.*, (1998), por medio de secuenciamiento del gen XRCC1 de 12 individuos obtuvo unas frecuencias alélicas de 0,25 (194Trp), 0,25 (399Gln) para las cuales en este caso no hay mucha relación. Sin duda la relación más notable se encuentra con un estudio brasilero de 300 individuos en donde se presentó una frecuencia de 0,07 para el alelo 194Trp y de 0,33 para el alelo 399Gln (Duarte, *et al.*, 2005), es decir, que estos valores son coherentes con los datos obtenidos en este estudio. De igual manera las

frecuencias halladas se encuentran entre los rangos establecidos por Goode, *et al.*, (2002) para el codón 194Trp de 0,06-0,35 y para el codón 399Gln 0,14-0,39. Las frecuencias encontradas en este estudio para la población caucana presentan similitud con las de la población blanca y en mayor medida con la población brasilera.

La frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC), estructurales en la célula fue la prueba de soporte para el desarrollo de la prueba de sensibilidad a mutágenos. Se usó el biomarcador de AC porque es un biomarcador validado y el primero que ha mostrado asociación con el riesgo de desarrollar cáncer (Hagmar *et al.*, 1994, 1998, 2004; Bonassi, *et al.*, 1995). Además, porque el macroproyecto que está desarrollando Hoyos, *et al.* (2006), usa el biomarcador de AC para evaluar su asociación con la exposición a solventes orgánicos y pinturas en la población caucana, de tal forma la población usada en este estudio es una subpoblación de la población evaluada en dicho macroproyecto. Por consiguiente, se tomaron los datos de las AC registradas en el macroproyecto, como los datos correspondientes a las AC sin tratamiento con mitomicina C (MMC), referenciados en este documento. Cabe resaltar que los resultados preliminares del macroproyecto de Hoyos, *et al.* (2006), han mostrado asociación entre la exposición y la frecuencia de AC, posiblemente atribuido a la propiedad genotóxica de algunos de los componentes de los solventes orgánicos tales como hidrocarburos policíclicos, benceno, tolueno, xileno, estireno, entre otros, los cuales pueden interactuar y alterar el ADN e inducir lesiones primarias o secundarias de cadena sencilla o doble (Cebulska-Wasilewska, *et al.*, 2007). El benceno desde 1982 ha sido clasificado como un carcinógeno humano por la Agency for Research on Cancer (IARC) y The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), (2005), y ha sido asociado con leucemia, trombocitopenia, granulocitopenia, entre otras enfermedades (Smith, *et al.*, 1998; WHO, 1993; Klaassen, 1996; Snyder, 2000), además Zhang, *et al.* (2002) mostró la genotoxicidad de la exposición al benceno asociada a un incremento en AC. El tolueno y el xileno usados en pinturas y *tinners*, no han mostrado evidencia de genotoxicidad en humanos o animales (WHO, 1997; 1986), sin embargo, Roma-Torres *et al.*, (2006), no consideraron que los daños genotóxicos de solventes orgánicos se deban solo al benceno. Los metabolitos del estireno como estireno-7,8-óxido, puede alquilar las bases del ADN primordialmente en la posición N⁷ de la guanina (Vodicka and Hemminki, 1988), también puede causar estrés oxidativo, y alterar el balance entre oxidantes y antioxidantes en células de la sangre (Marczynski *et al.*, 1997), además la IARC ha clasificado al estireno y al estireno-7,8-óxido como probables carcinógenos en humanos (IARC, 1994). Las investigaciones que relacionan efectos genotóxicos asociados a los solventes orgánicos son muchas como se describió anteriormente pero no se han empleado biomarcadores de función o susceptibilidad, como la prueba de sensibilidad a mutágenos en la población expuesta a solventes orgánicos y pinturas, tal como se realizó en este estudio.

Para comenzar con los resultados obtenidos para la prueba de sensibilidad a mutágenos, cabe resaltar que el mutágeno (MMC), usado en la prueba de sensibilidad a mutágenos (SM), al igual que algunos de los componentes de los solventes orgánicos y pinturas

(benceno, estireno), producen el mismo tipo de daño en el ADN, es decir, alquilación del ADN, *crosslinks* en secuencias CpG y rupturas de cadena sencilla (Mao, *et al.*, 1999; Laffon, *et al.*, 2002; Sigma-Aldrich, 2007); lo que indica que las alteraciones cromosómicas inducidas *in vitro* con MMC que se encontraron, fueron causadas por el mismo tipo de daño producido por los solventes orgánicos y pinturas. Al producirse daños en el ADN provenientes de la mitomicina C (como la alquilación del ADN y rupturas de cadena), la prueba de sensibilidad a mutágenos, puede evaluar en forma indirecta a la eficiencia de reparación por escisión de bases (BER) (Gu, *et al.*, 1999; Lunn, *et al.*, 1999), (en la que interviene el gen XRCC1), teniendo en cuenta que BER repara daños tales como alquilaciones, bases oxidadas, sitios AP, radicales libres y rupturas de cadena sencilla (Caldecott, 2003, Dienov, *et al.*, 2003).

En la asociación entre la prueba de sensibilidad a mutágenos y los grupos evaluados (Individuos de referencia/expuestos), se encontraron diferencias significativas para el número de AC inducidas de tipo cromatídico ($P = 0,01$) y AC inducidas totales, ($P = 0,003$). Es decir, que los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas obtuvieron una mayor frecuencia de AC de tipo cromatídico ($1,28 \pm 0,274$) y AC totales ($1,66 \pm 0,298$), con relación al grupo referente ($0,38 \pm 0,219$); ($0,54 \pm 0,229$). Estos resultados mostraron que los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas por causa de su exposición son deficientes en la reparación de lesiones inducidas *in vitro* por MMC. Esto indica que las células de los individuos expuestos son más susceptibles al daño en presencia de mutágenos químicos (a los que están expuestos todo el tiempo). De tal manera la exposición afecta sus sistemas de reparación ocasionando una deficiencia en la reparación (mal funcionamiento) y por su constante exposición a largo plazo pueden afectar su salud y su calidad de vida.

Poblaciones expuestas a mutágenos ambientales evaluadas con la prueba de sensibilidad a mutágenos han mostrado asociaciones entre la exposición y la eficiencia de reparación, tal como la relación encontrada en individuos expuestos a butadieno, en donde se encontró una correlación entre la prueba de challenge (sensibilidad a mutágenos), y el metabolito 1,2-dihidroxy-4-(N-acetil cysteinyl) butano en orina (Hallberg, *et al.*, 1997). En una población expuesta a mezclas de pesticidas se encontró un significativo incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas inducidas (Au, *et al.*, 1999). Para la población expuesta a uranio se encontró un incremento en alteraciones cromosómicas inducidas por rayos gama, además de un incremento en las AC sin inducción de lesiones, indicando riesgo de desarrollar enfermedad (Au, *et al.*, 1995); también en constructores de botes expuestos a bajas concentraciones de estireno se encontró una alta frecuencia de AC inducidas con rayos gama. En todos los estudios anteriores se ha revelado una relación entre una mayor frecuencia de AC inducidas en los individuos expuestos. Es claro que la prueba de sensibilidad a mutágenos evalúa una respuesta celular ante la exposición ambiental/ocupacional y la susceptibilidad adquirida, y que sus resultados pueden ser utilizados para predecir el riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer (Hsu, *et al.* 1989; Au, 2003), por lo tanto, según los resultados obtenidos es posible decir que, la

población de individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas tienen alto riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer por su deficiente mecanismo para reparar lesiones en el ADN.

Para la relación entre la edad y el número de AC inducidas en toda la población (Individuos de referencia y Expuestos), no se presentó asociación estadísticamente significativa (A.ct $P = 0,259$ A.cm $P = 0,273$ AC $P = 0,09$). Es posible que los datos relacionados con la edad de los individuos estén presentes y sean observables dentro del número de AC de células sin tratamiento, dada la degeneración natural del organismo a medida que pasa el tiempo, sin embargo, los datos de la prueba de SM evalúan la eficiencia de reparación de lesiones inducidas con MMC y para este caso la no asociación con la edad indica que la población presenta una reparación de lesiones similar independientemente de la edad. Además, los datos se limitan a expresar la sensibilidad a mutágenos de una respuesta citotóxica (ante la mitomicina c), que puede indicar un incremento en el riesgo de desarrollar problemas de salud (Au, 2003). Estos resultados son comparables con los obtenidos por Gu, *et al.*, (1999), quien no encontró significancia estadística para la relación entre la sensibilidad a mutágenos y la edad ($P = 0,233$) en una población de 56 individuos sanos. Aunque en estudios realizados por Zheng, *et al.* (2003), se encontró una frecuencia de AC significativamente mayor en individuos con más de 65 años con respecto a individuos con menos de 65 años; pero en este caso el límite superior de edad fue de 55 años.

El tiempo de exposición al igual que la edad no presentó significancia estadística para la relación con las AC inducidas (A.ct $P = 0,215$ A.cm $P = 0,898$, AC $P = 0,261$). Ahora bien, la hipótesis presentada por Au, *et al* (2001), sugiere que “cada exposición prolongada puede causar una acumulación de células anormales, las cuales transportan diferentes tipos de lesiones”, que pueden afectar cualquier mecanismo del sistema de reparación del ADN, teniendo en cuenta su extensión y complejidad. De lo anterior se puede inferir que las células provenientes de los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas pueden venir con una carga anormal de lesiones, que se expresarán en el número de AC de células sin tratamiento, por lo tanto las alteraciones acumulativas son despreciables para la prueba de sensibilidad a mutágenos, puesto que esta prueba evaluó la eficiencia de reparación de las células al ponerse en contacto con la MMC.

Para el total de la población (Individuos de referencia y Expuestos), la modulación del gen XRCC1 codones 194 y 399 no presentó una significancia estadística ($P > 0.05$), con relación al número de AC inducidas encontradas, es decir, que para este estudio la influencia del gen XRCC1 no fue evidente sobre la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN. Es probable que la muestra (suficiente para la prueba de sensibilidad a mutágenos), no haya sido suficiente para identificar un efecto modulador de los polimorfismos del gen XRCC1 en la población total. Aunque se ha reportado en la literatura que los polimorfismos del gen XRCC1 tienen una potencial repercusión funcional (Caldecott, 1996, 2003).

El polimorfismo del codón 194 está localizado al lado de dos secuencias mediadoras de las interacciones proteína-proteína con la Poly (ADP ribosa) polimerasa (PARP) y la polimerasa beta, y el codón 399 se encuentra en el dominio de unión BRCT1 que interviene en la interacción entre XRCC1 y PARP (Thompson *et al.*, 2000), por lo tanto los polimorfismos de estos genes pueden afectar la interacción proteína-proteína y así también la capacidad de reparación. El cambio de aminoácido Arg194Trp no parece afectar a la eficiencia de reparación (prueba de sensibilidad a mutágenos) (Abdel-Rahman and El-Zein 2000b; Hu *et al.*, 2001; Lunn; *et al.*, 1999), aunque se han descrito asociaciones de un reducido riesgo de algunos tipos de cáncer con el alelo 194Trp (Sturgis, *et al.*, 1999; Stern, *et al.*, 2001; Goode, *et al.*, 2002). Para el codón 399 la mayoría de estudios indican que el cambio de aminoácido Arg399Gln si está asociado con la reducción en la eficiencia de reparación del ADN, ya que se ha descrito su asociación con cáncer de cuello y cabeza (Sturgis, *et al.*, 1999), cáncer colonrectal (Abdel-Rahman, *et al.*, 2000a), cirrosis hepática alcohólica (Rossit *et al.*, 2002), entre otros. También se ha descrito la relación entre el alelo 399Gln con el incremento de ICHs inducidos por una nitrosamina del tabaco (Abdel-Rahman and El-Zein, 2000b), y una baja reparación asociada con el alelo 399Arg/Gln o 399Gln/Gln en trabajadores expuestos a Benceno.

Al evaluar la asociación entre la exposición (Referente o expuesto), el genotipo del gen XRCC1 codón 194 y las AC inducidas *in vitro* con la MMC, (Tabla 6), se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,009$), es decir, se encontró que (Figura 6), los individuos de referencia que presentaron el alelo 194Trp tenían un menor número de AC inducidas, y por lo tanto reparaban mejor que los individuos que tenían el genotipo silvestre 194Arg; ahora bien al observar a los individuos expuestos con el alelo 194Trp se encontró un aumento en el número de AC inducidas (reparaban mal) con respecto a los individuos expuestos con alelo silvestre 194Arg, estos resultados evidencian una interacción gen-ambiente para los individuos con genotipo 194Trp y expuestos a solventes orgánicos.

El resultado encontrado en los Individuos de referencia, que atribuye una menor eficiencia de reparación para los individuos con el genotipo Arg194Arg, es comparable con un estudio realizado por Wang, *et al.* (2003), ellos encontraron que el genotipo silvestre 194Arg/Arg expresaba unos altos valores de ACs inducidas, para la prueba de sensibilidad a mutágenos en 524 individuos sanos, esto indica que individuos con 194Arg/Arg y sin exposición son menos eficientes al reparar daños en el ADN. Ahora bien, la interacción gen-ambiente encontrada en este estudio para los individuos expuestos con genotipo Arg194Trp difiere de lo descrito por Breton, *et al.*, (2006), en un estudio caso-control, donde se evaluó al gen XRCC1 codón 194 para una población expuesta a arsénico que presentaba lesiones de piel, el estudio encontró que individuos que presentaban el polimorfismo Trp194Trp presentaban menos lesiones de piel con respecto a los individuos Arg194Arg. Cabe anotar que estudios que relacionen la prueba de sensibilidad a mutágenos con exposición ambiental/ocupacional y el genotipo del gen XRCC1, en realidad no se

encontraron luego de consultar en las bases de datos más reconocidas, PUBMED, ISI web of knowledge , science direct, google scholar, google.

Al evaluar la asociación entre la exposición (Individuos de referencia o expuesto), el genotipo del gen XRCC1 codón 399 y las AC inducidas, (Tabla 6), se encontró una asociación estadísticamente significativa (0,016) (Figura 6). Los individuos de referencia que presentaron la variante Gln399Gln tenían un menor número de AC inducidas, y por lo tanto reparaban mejor que los individuos que tenían el genotipo silvestre Arg399Arg o heterocigótico Arg399Gln; ahora bien, para los individuos expuestos se observó que todos los individuos independientemente del genotipo presentaron un incremento en el número de AC inducidas con MMC, sin embargo, los individuos expuestos con alelo Gln399Gln presentaron un cambio más marcado (reparación deficiente) con relación a los individuos referentes con el mismo genotipo (reparación eficiente), estos resultados evidencian una interacción gen-ambiente para los individuos con genotipo 399Gln y expuestos a solventes orgánicos, denotando mayor susceptibilidad ante la exposición de los individuos con la variante alelica Gln. Respuestas similares de interacción gen-ambiente han sido reportadas anteriormente, en ellas, el genotipo y el riesgo de cáncer fueron afectados por el hábito de fumar, encontrando que los individuos con genotipos Arg399Gln y Gln399Gln presentaban un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Misra, *et al.*, 2003), de igual forma en otros estudios se ha reportado que la variante alélica 399Gln está asociada con cáncer de cabeza y cuello, además que esta asociación fue más pronunciada en personas fumadoras (Sturgis, *et al.*, 1999). Se ha hallado asociación para el alelo 399Gln y el incremento de riesgo de carcinoma de células escamosas de pulmón, siendo más pronunciado en fumadores (Park, *et al.*, 2002). Sin embargo, específicamente con la prueba de sensibilidad a mutágenos, exposición ambiental/ocupacional y el genotipo del gen XRCC1, no se encontraron estudios luego de hacer una fina búsqueda en las bases de datos anteriormente mencionadas.

Ahora bien, el polimorfismo del codón 194 (C→T) se localiza al lado de dos secuencias mediadoras de las interacciones proteína-proteína con la Poly (ADP ribosa) polimerasa (PARP) y la polimerasa beta (Thompson *et al.*, 2000), y el polimorfismo del codón 399 (G→A) se encuentra en el dominio de unión proteína-proteína de la Poly (ADP ribosa) polimerasa (PARP), (Tuimala, *et al.*, 2002). Puede que el incremento del daño que se presentó en los individuos expuestos con las variantes 194Trp y 399Gln sea el reflejo de algún tipo de interacción con la proteína XRCC1 o con el mRNA de los componentes de los solventes orgánicos y pinturas, que esté relacionada con la secuencia del aminoácido (el cambio de los aminoácidos). Aquí se puede observar la confirmación de la hipótesis de Loeb *et al.*, (1997) y Lengauer *et al.*, (1997) quienes afirmaron que “Las células de individuos expuestos a mutágenos ambientales probablemente expresarían una inestabilidad genética o fenotipo mutador”.

De los resultados obtenidos en este estudio es posible postular que el fenotipo del gen XRCC1 codón 194 y 399 posiblemente interfieran en la eficiencia de reparación de lesiones en el ADN, actuando de manera distinta cuando existe una acción ambiental (exposición a solventes orgánicos y pinturas). De ser así, posiblemente se vea alterada la interacción proteína-proteína de la cadena de reparación por escisión de bases (Lunn, *et al.*, 1999) y por ende la eficiencia de reparación. Además, se puede evidenciar el potencial riesgo de desarrollar cáncer de los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas y la correlación entre el genotipo y la prueba de sensibilidad a mutágenos de acuerdo con la hipótesis planteada por Lin, *et al.*, (2007) que postula que “Si el polimorfismo genético en genes de reparación tienen una significancia funcional entonces puede haber una correlación entre el genotipo y la sensibilidad a mutágenos sirviendo está última como un intermediario fenotípico para predecir el riesgo de cáncer”.

Este estudio muestra una clara interacción Gen – Ambiente, donde estos dos factores están influenciando el proceso de reparación modificando la respuesta biológica a la exposición ocupacional a agentes genotóxicos/mutagénicos de individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas. Los resultados indicaron que el factor determinante para este estudio fue la exposición, teniendo en cuenta que ni la edad, ni el tiempo de exposición, ni el polimorfismo del gen XRCC1 tuvieron asociación con la expresión de la sensibilidad a mutágenos. Esto sugiere que los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas son más susceptibles, y por ende tienen mayor riesgo de desarrollar problemas graves de salud tales como el cáncer.

10. CONCLUSIONES

La asociación encontrada entre la exposición y el incremento en el número de AC inducidas *in vitro* con la MMC, indica mayor susceptibilidad de los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas para desarrollar problemas de salud.

La ausencia de asociación entre las AC inducidas y la edad y las AC inducidas y el tiempo de exposición no necesariamente indica una ausencia de relación, posiblemente con un tamaño de muestra mayor o con otro tipo de evaluaciones esa asociación se haga evidente.

Con respecto a la modulación del gen XRCC1 sobre la eficiencia de reparación, cabe resaltar que si bien, no se encontró en primera instancia una asociación evidente tanto para el Arg194Trp como para el Arg399Gln en el total de la población (Individuos de referencia y expuestos), la asociación encontrada cuando interviene el factor exposición indica una modulación proveniente del gen en respuesta a la exposición, una relación Gen-Ambiente.

En relación con la caracterización de los polimorfismos del gen XRCC1 codón 194-399, se contribuyó, con más datos acerca de las frecuencias alélicas para el Cauca y para Colombia.

Es evidente que los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas, se ven afectados por esta exposición ocupacional, pero definitivamente, estos efectos se pueden reducir con un manejo adecuado de las sustancias tóxicas y con el uso de medidas de bioseguridad. En realidad esto solo se logrará con un proceso de concientización de los individuos expuestos y con la creación de una cultura de prevención.

11. RECOMENDACIONES

Al ser el sistema de reparación tan complejo resultaría conveniente implementar en la prueba de sensibilidad a mutágenos otros agentes inductores de daños, tales como la bleomicina, el Benzo[a]pireno-diol-epoxido (BPDE), los rayos X, los rayos Gama, entre otros. De esta manera se podrían evaluar la eficiencia de reparación de diferentes tipos de daño y de diferentes rutas de reparación, además, los resultados obtenidos de estos estudios serían de una relevancia científica más relevante.

Teniendo en cuenta, que el daño en el ADN es el producto de muchas interacciones en el organismo y en el ambiente, se recomienda la evaluación de poblaciones expuestas implementando biomarcadores de exposición, de efecto y susceptibilidad.

Para un mejor análisis y evaluación de los sistemas de reparación se recomienda la caracterización conjunta de más polimorfismo de genes de reconocido efecto modulador funcional para complementar el entendimiento de las rutas de los sistemas de reparación.

En cuanto a los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas se recomienda mayor atención a la implementación de programas de prevención para el manejo de las sustancias tóxicas que se ven obligados a usar en su trabajo diario.

Finalmente la principal recomendación va dirigida hacia los sistemas de salud para su oportuna intervención con los individuos en riesgo de desarrollar problemas de salud por medio de programas educativos, folletos informativos, etc. Tal como ha intentado hacerlo el Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca.

12. IMPACTO

Este estudio, contribuye con el conocimiento científico básico del gen XRCC1 para la distribución de las frecuencias alélicas de los codones 194 y 399 en la población caucana.

Con la estandarización del protocolo de PCR-Multiplex-RFLPs para la caracterización del gen XRCC1 codón 194-399 se logró disponer en el laboratorio de una técnica que implica un ahorro de tiempo y reactivos permitiendo identificar variaciones genéticas en la población ocupacionalmente expuestas a solventes orgánicos y pinturas.

Al implementar la prueba de sensibilidad a mutágenos con mitomicina C para evaluar la eficiencia de reparación en el ADN además de la PCR-RFLPs, en la población del departamento del Cauca-Colombia, se contribuye con la innovación del uso de técnicas usadas a nivel mundial, demostrando el interés de los grupos de investigación de países subdesarrollados por fomentar la investigación científica de alto nivel.

Se contribuyó al desarrollo del principal objetivo del Proyecto Genoma Ambiental el cual es “entender como los individuos difieren en susceptibilidad (Genética y Adquirida), a los agentes ambientales y como esta susceptibilidad influye a través del tiempo”.

Con el uso de biomarcadores de susceptibilidad se pudo identificar el posible riesgo de desarrollar problemas de salud de los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas. Estos resultados se pueden tomar como una señal de alerta para la población y para las entidades y autoridades responsables de la salud pública para contemplar planes de prevención y promoción de la salud en individuos en riesgo por la exposición ocupacional.

Se contribuyó con la concientización de los individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas desde el momento de la motivación para la participación en el estudio. Además los resultados de este estudio se darán a conocer por la población en un seminario dirigido hacia ellos, y de esta manera informarlos de los posibles riesgos que tienen por estar expuestos a solventes orgánicos y pinturas. También se les dará algunas recomendaciones de manejo y se espera generar en ellos una actitud y un manejo más responsable para con las sustancias que usan en su trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-RAHMAN, S *et al.* Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. En: Cancer Letters. Vol. 159 (2000a); p, 79-86.

_____. S; and El-Zein. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NND. En: Cancer Letters. Vol.159 (2000b), p, 63-71.

ACGIH. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices, American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati. (2005).

Affatato, A. *et al.* Effect of XPD/ERCC2 polymorphisms on chromosome aberration frequencies in smokers and on sensitivity to the mutagenic tobacco-specific nitrosamine NNK. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 44 (2004), p, 65-73.

ALMEIDA, M *et al.* Chromosomal aberrations analysis in workers exposed to chemicals and biological hazards in research laboratories. En: Environmental Research. Vol. 97 (2005); p, 330-334.

AU, W.; W; HEO, M. and CHIEW, C. Toxicological interactions between niquel and radiation on chromosome damage and repair. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 102 (1994); p, 73-77.

_____. W *et al.* Biomarker monitoring of a population residing near uranium mining activities. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 103 (1995); p, 466-470.

_____. W. *et al.* Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 104 (1996); p, 579-584.

_____. W. *et al.* Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility, En: Environmental Health Perspectives. 107 (1999) 501–505.

_____. W *et al.* Biomarker monitoring for health risk based on sensitivity to environmental mutagens. En: Environmental Health. Vol. 16 (2001); p, 41-64.

_____. W. Mutagen sensitivity assays in population studies. En: Mutation Research. Vol. 544 (2003), p, 273–277.

BLAIR A., ROTHMAN N., and HOAR S. Occupational cancer epidemiology in the coming decades. En: Scand Journal Work Environmental Health. Vol. 25 (1999); p, 491-497.

BOGAARD, P; ROCCHI, P. and VAN-SITTERT, N. Biomonitoring of exposure to ethylene oxide and propylene oxide by determination of hemoglobin adducts: correlation between airborne exposure and adducts levels. En: Int. Arch. Occupational Environmental Health. Vol. 72 (1999); p, 142-150.

BOHR, V. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. En: Carcinogenesis. Vol. 16 (1995); p, 2885–2892.

BONASSI, S *et al.* Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. En: Cancer Genetic and Cytogenetic. Vol. 79 (1995); p, 133-135.

_____, S *et al.* Human population studies with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 45 (2005); p, 258-270.

BRETON, C *et al.* The Effect of Polymorphisms in Base Excision Repair on Arsenic-Induced Skin Lesions. En: Epidemiology. Vol. 17 (2006); p, S341.

BROWN, M *et al.* Exposure in the painting trades and paint manufacturing industry and risk of cancer among men and woman in Sweden. En: Occupational Environmental Medicine. Vol. 44 (2002); p, 258-264.

CALDECOTT, K; TUCKER, J. and THOMPSON, L. Construction of human XRCC1 minigenes that fully correct the CHO DNA repair mutant EM9. En: Nucleic Acids Research. Vol. 17 (1992); p, 4575-4579.

_____. K *et al.* An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. En: Molecular Cell Biology. Vol. 1 (1994); p, 68-76.

_____. K *et al.* XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. En: Nucleic Acids Research. Vol. 22 (1996); p, 4387-4394.

_____. K. XRCC1 and DNA strand break repair. En: DNA repair 2. Vol. 2 (2003), p, 955-969.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A., *et al.*, Repair competence assay in studies of the influence of environmental exposure to c-PAHs on individual susceptibility to induction of DNA damage. En: Mutation Research. Vol. 620 (2007), p, 155–164.

CHEN, S *et al.* DNA Repair Gene XRCC1 and XPD Polymorphisms and Risk of Lung Cancer in a Chinese Population. En: Carcinogenesis. Vol. 23 (2002); p,1321-1325.

CHRISTMANN, M. *et al.*, Mechanisms of human DNA repair: an update. Vol. 193 (2003), p, 3-34

CHU, G. and MAYNE, L. Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the gene explain the diseases?. En: Trends Genetics. Vol. 12 (1996); p, 187-192.

CLOOS, J *et al.* Inherited susceptibility to Bleomycin-induced chromatid breaks in cultured peripheral blood lymphocytes. En: Journal of National Cancer Institute. Vol. 91 (1999); p, 1125-1130.

COLLINS, A. Molecular Epidemiology in Cancer Research. En: Molecular Aspects Medical. Vol. 19 (1998); p, 359-432.

_____, Comisión nacional del medio ambiente–región metropolitana. En: Guía para el control y prevención de la contaminación industrial. Recuperación de solventes. Santiago de Chile. (1999); p, 36-38.

CZENE, K. *et al.* Analysis en DNA and hemoglobin adducts and sister chromatid exchanges in a human population occupationally exposure to propylene oxide: A pilot study. En: Cancer Epidemiology. Biomarkers prevent. Vol. 11 (2002); p, 315-318.

DAVID-BEABES and LONDON, Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African – Americans and Caucasians. En: Lung Cancer. Vol. 34 (2001), p, 333-339.

DIENOV, *et al.*, Repair of abasic sites in DNA. En: Mutation Research. Vol. 531 (2003), p, 157-163.

DOLL, R. and PETO. R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. En: Oxford University Press, Oxford. 1981.

DUARTE, *et al.* Polymorphism of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in a Brazilian polulation. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 28 (2005), p, 1-8.

DUELL. E *et al.* Polymorphisms in the DNA Repair Genes XRCC1 and ERCC2 and Biomarkers of DNA Damage in Human Blood Mononuclear Cells. En: Carcinogénesis, Vol. 21 (2000); p, 965-971

EL-ZEIN, R *et al.* Chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from skin-cancer prone patients. En: Mutation Research. Vol. 335 (1995); p, 143-149.

Environmental Genome Project (EGP). National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) [online] Nov. 28 2007 [cited Dic. 13 2007]. Available from internet <URL: <http://www.niehs.nih.gov/research/supported/programs/egp/>>

ERDEI, E, *et al.* Reliability of mutagen sensitivity assay: an inter-laboratory comparison. En: Mutagenesis Advance. Vol.26 (2006), p,1-4.

FAUST, F *et al.* The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. En: Mutation Research. Vol. 566 (2004); p, 209-229.

GOODE E; ULRICH, C, and POTTER J. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Vol. 11, (2002), p, 1513–1530.

GROOPMAN, J; KENSLER, T. and LINKS, J. Molecular epidemiology and human risk monitoring. En: Toxicology Letters. Vol. 89 (1995); p, 763-769.

GU, J. *et al.* Three Measures of mutagen sensitivity in a cancer-free population. Vol. 110 (1999); p, 65-69.

HAGMAR, L *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. En: Cancer Research. Vol. 11 (1994); p, 2919-2922.

_____. L *et al.* Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs. Recent Results. En: Cancer Research. Vol. 154 (1998); p, 177-84.

HALLBERG, L. Measurement of DNA repair deficiency in workers exposed to benzene. En: Environmental Health Perspective. Vol.104 (1996), p, 529–534.

_____. L. Abnormal DNA repair activities in lymphocytes of workers exposed to 1,3-butadiene. En: Mutation Research. Vol.383 (1997), p, 213–221.

HARMS, C; SALAMA, A.. and SIERRA, H. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations and lung cancer. En: Environmental Molecular Mutagen. Vol. 44 (2004); p, 74-82.

HITARA, H *et al.* Polimorphisms of DNA repair genes are associated with renal cell carcinoma. En: Biochemical and Biophysical Research Comunitacion. Vol. 342 (2006); p, 1058-1056.

HOYOS, L. Monitoreo, Susceptibilidad y Cáncer. Colombia. Universidad Del Cauca. (2000). p.7-19.

HOYOS, L; CARVAJAL, S. y CAJAS, N. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Departamento de Biología. Universidad del Cauca. Popayán. Vol. 1 (2002); p, 8-30.

HOYOS, *et al.*, Asociación de Alteraciones Cromosómicas, Polimorfismo Genéticos y Potenciales Riesgos de Salud por la Exposición Ocupacional a Solventes Orgánicos. (2006). Proyecto en ejecución.

HSU, T. *et al.* Cytogenetic analysis of chromosome instabilities in human population. En: Short-Term Test for Chemical Carcinogens; (1981); p. 217-235. Citado por: AU, W. *et al.* Biomarker monitoring for health risk based on sensitivity to environmental mutagens. En: Environmental Health. Vol. 16 (2001); p, 41-64.

_____. T. Genetic instability in the human population: a working hypothesis En: Hereditas. Vol. 98 (1983); p, 1–9.

_____. T *et al.* Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis, En: International Journal Cancer. Vol. 43 (1989); p, 403–409.

HU, J. *et al.* Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. En: Carcinogenesis. Vol. 22 (2001), p, 917-922.

Human Genome Program. U.S. Department of Energy Office of Science, Office of Biological and Environmental Research [online] Jul. 16 2007 [cited nov. 20 2007]. Available from internet <URL: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml>

IARC. International agency for research on cancer. Some organic solvents, resins monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 47 (1989).

_____.. Some industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. En: International Agency for Research on cancer, Lyon. (1994); p, 233-320.

KASUBA, V; ROZGAJ, R. and SENTIJA, K. Cytogenetic changes in subjects occupationally exposed to benzene. En: Chemosphere. Vol. 40 (2000); p, 102-107.

KIRKELEIT, *et al.* Biological monitoring of benzene exposure during maintenance work in crude oil cargo tanks. En: Chemico- Biological Interactions. Vol. 164 (2006); p, 60-67.

KLAASSEN, C. The Basic Science of Poisons. En: McGraw-Hill. New York. (1996).

KOKABAS, N *et al.* Influence of GSTM1 genotype on comet assay and chromosome aberration after induction by Bleomycin in cultured human Lymphocytes. Vol. 469 (2000); p, 199-205.

LACZMANSKA, I. *et al.* Polimorphism in XPC coding for nucleotide excision repair, correlates with bleomycin-induced chromosomal aberrations. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 48 (2007), p, 666-671.

LAFFON, B.; PASARO, E. and MENDEZ, J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxido measured by the comet assay. En: Toxicology Letters. Vol. 126 (2002), p, 61-68.

_____. B; *et al.* Papel de los polimorfismos genéticos para enzimas de reparación en el daño en el ADN inducido por el estireno y estireno- 7,8- oxido. En: Toxicology. Vol. 21 (2004), p, 92-97.

LENGAUER, C; KINZLER, K. and VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancer En: Nature. Vol. 386 (1997); p, 623-627.

LEE, J. *et al.* A estatistical analysis of the reliability and classification error in application of the mutagen sensitivity assay. En: Cancer epidemiology biomarkers and prevention. Vol. 5 (1996), p, 191-197.

LIN, J. Mutagen sensitivity and genetic variants in nucleotide excision repair pathway: Genotype-Phenotype correlation. En: Cancer epidemiology biomarkers and prevention. Vol. 16 (2007); p, 2065–2071.

LOEB, L. Transient expression of a mutator phenotype in cancer cells. En: Science. Vol. 277 (1997); p, 1449-1450

LOPEZ-ABENTE *et al.* Leukemia, lymphomas and myeloma mortality in the vicinity of nuclear power plants and nuclear fuel facilities in Spain. En: Cancer Epidemiology. Biomarkers Prevent. Vol. 8 (1999); p, 925-934.

_____. A, G; ARAGONES, N. y POLLAN, M. Solid tumor mortality in the vicinity of uranium cycle and nuclear power plants in Spain. En: Environmental Health Perspectives. Vol 109 (2001); p, 721-729.

LUNN, R *et al.* XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin a variant frequency. En: Cancer Research. Vol. 59 (1999); p, 2557–2561.

MAO, Y.; VAROGLU, M. and SHERMAN, D. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. En: Chemistry & Biology. Vol.6 (1999), p, 251-263.

MARCZYNSKI, B.; PEEL, M. and BAUR, X. Change in high molecular weight DNA fragmentation following human blood exposure to styrene-7,8-oxido. En: Toxicology. Vol.120 (1997), p, 11-117.

MATSUO, K *et al.* Lack of association between DNA base excision repair gene XRCC1 Gln399Arg polymorphisms and risk of malignant lymphoma in Japan. En: Cancer Genetic and Cytogenetic. Vol. 149 (2004); p, 77-80.

MATULLO, G *et al.* XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. En: Carcinogenesis. Vol. 9 (2001); p, 1437-1445.

MILLER, M.; MOHRENWEISER, H. and BELL, D. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. En: Toxicology Letters. Vol. 120 (2001); p, 269–280.

MISRA, R. *et al.* Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland. Vol. 191 (2003), p, 171-178.

MOHRENWEISER, H *et al.* Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2 y XRCC1 on human chromosome 19. En: Cytogenetic Cell Genetic. Vol. 52 (1989); p, 11-14.

_____. W. and JONES, I. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils for individual and population risk estimation?. En: Mutation Research. Vol. 400 (1998); p, 15-24.

NIÑO PÉREZ, R. y CAMARGO, J. Caracterización del *thinner* para la industria de pinturas de uso domestico en Santafé de Bogota D.C. por cromatografía de gases. Santafé de Bogotá, 1999., 46p. Trabajo de grado (Química Farmacéutica). Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia.

NORPPA, H. Cytogenetic Biomarkers. En: IARC Science Publish. Vol. 157 (2004); p, 179-205

OBERHEITMANN, B *et al.* The chromosome-based challenge assay using fluorescence in situ hybridization: a possible test for increased cancer susceptibility. En: Mutation Research. Vol. 428 (1999); p, 157-164.

OTSUKA, F *et al.* Hypersensitivity to ionizing radiation in cultured cells from Down syndrome patients. En: Journal Neurology Science. Vol. 69 (1985); p, 103-112.

PADOVANI, L. *et al.* Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit and adaptive response? I. Challenge with ionizing radiation. En: Mutation Research. Vol. 332 (1995), p, 33-38.

PALLI, D *et al.* DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. En: International Journal of Cancer. Vol. 1 (2001); p, 121-127.

PARK, J. *et al.* Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of primary lung cancer. En: Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevent. Vol. 11 (2002), p, 23-27.

PARSHAD, R *et al.* G2 chromosomal radiosensitivity of ataxia-telangiectasia heterozygotes. En: Cancer Genetic and Cytogenetic. Vol. 14 (1985); p, 163-168.

_____. R *et al.* Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. En: Journal Biol. Chem. Vol. 271 (1996); p, 16000–16007.

PEÑA, C *et al.* Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. En: Southwest Hazardous Waste Program A Superfund Basic Research and Training Program At the College of Pharmacy The University of Arizona. 2001. p. 68-70.

PERÍ, S. Calidad de aguas y biomarcadores. Las respuestas bioquímicas y fisiológicas: su aplicación en el control de la calidad de agua. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de la Plata. (2001).

PISCOYA-ALBAÑIL, J. Toxicidad de los solvente como riesgo ocupacional. Docente Universidad Nacional de Piura. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna. Vol 13 (2000).

PLAPPERT, U. *et al.* Early effects of benzene exposure in mice. Hematological versus genotoxic effects. En: Arch. Toxicol. Vol. 68 (1994), p, 284–290.

POTT P. Chirurgical Works of Percival Pott, F.R.S. and Surgeon to St. Bartholomew's Hospital. London: Hawes, W. Clarke, and R. Collins, in Paternoster Row. (1775).

PRÜSS-ÜSTÜN, A. y CORVALÁN, C. Ambientes saludables y prevención de enfermedades: hacia una estimación de la carga de morbilidad atribuible al medio ambiente: resumen de orientación. Organización Mundial de la Salud. (2006).

RAMACHANDRAN, S *et al.* Single nucleotide polymorphism of DNA repair genes XRCC1 and XPD and its molecular mapping in Indian oral cancer. En: Oral Oncology. Vol. 42 (2006); p, 350-362.

RATNASINGHE, D. *et al.* Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. En: Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevent. Vol. 10 (2001), p, 119-123.

RAYJEAN, J *et al.* Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk. En: American Journal of Epidemiology. Vol. 162 (2005); p, 925-942.

RODRIGUEZ, M; SQUILLANTE, G. y ROJAS, M. Exposición ocupacional a solventes orgánicos en una fábrica de calzado en Valencia, Venezuela, 2001. En: Gaceta Médica de Caracas. Vol. 111 (2003); p, 294-301.

ROMA-TORRES, J *et al.* Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. En: Mutation Research. Vol. 604 (2006); p. 19–27

ROSSITI, A. *et al.* Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older southeastern Brazilians. En: Cancer Letters. Vol. 180 (2002), p,173-182.

SANZ, P. El análisis de polimorfismos de ADN puntuales (SNPs) en toxicología, Instituto Nacional de Toxicología. Sevilla. En: Revista de Toxicología. Vol. 19 (2002); p, 97-144.

SEONG-GENE, L *et al.* Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. En: Cancer Letters. Vol. 187 (2002); p, 53-60.

SHAFIT, H; AU, W. and LEGATOR, M.. Chromosomal radiosensitivity of Down syndrome lymphocytes at different stages of the cell cycle. En: Human Genetic. Vol. 78 (1988); p, 71-75.

SHEN, M; JONES, I. and MOHRENWEISER, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. En: Cancer Research. Vol. 58 (1998); p, 604–608.

SICILIANO, M; CARRANO, A. and THOMPSON, L. Assignment of a human DNA repair gene associated with sister chromatid exchange to chromosome 19. En: Mutation Research. Vol. 174 (1986); p, 303-308.

SIGMA-ALDRICH. Cellular mechanism and cancer. En: Biofiles for Life Science Research. Vol. 2 (2007); p, 9, 20-22, 26.

SMITH, M. and ZHANG, L. Biomarkers of leukemia: benzene as a model. En: Environmental Health Perspectives. Vol.106 (1998), p, 937–946.

SNYDER, R. Overview of the toxicology of benzene (Part A) En: Journal of Toxicology Environmental Health. Vol.61 (2000), p, 339–346.

SPITZ, M et al. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. En: Cancer Research. Vol. 49 (1989); p, 4626–4628.

_____. M et al. Mutagen sensitivity as a biologic marker of lung cancer risk in African Americans. En: Cancer epidemiology. Vol. 4 (1995); p, 99-103.

STERN, M. et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphism, smoking, and bladder cancer risk. En: Cancer Epidemiology Biomarkers Prevent. Vol.10 (2001), p, 125-131.

STOEHLMACHER, J. et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. En: Anticancer Research. Vol. 21 (2001), p, 3075-3079.

STURGIS, E. et al. Polymorphism of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. En: Carcinogenesis. Vol. 20 (1999), p, 2125-2129.

TALASKA, G. et al., Carcinogen biomonitoring in human exposures and laboratory research: validation and application to human occupational exposures. En: Toxicology Letters. Vol. 134 (2002), p, 39-49

TEDESCHI, et al. Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit and adaptive response? III, challenge with bleomycin in lymphocytes from children hit by the initial acute dose of ionizing radiation. En: Mutation Research. Vol. 354 (1996), p, 77-80.

THOMPSON, L *et al.* Complementation of repair gene mutation on the homizigous chromosome 9 in CHO: a third repair gene of human chromosome 19. En: Genomics. Vol. 5 (1989); p, 670-679.

_____. L *et al.* Molecular Cloning of the *XRCC1* Gene Which Corrects Defective DNA Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange. En: Molecular Cell Biology. Vol. 10 (1990); p, 6160-6171.

_____: L. and WEST, M. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. En: Mutation Research. Vol. 459 (2000); p, 1-18.

TUIMALA, J *et al.* Genetic Polymorphisms of DNA Repair and Xenobiotic Metabolizing Enzymes: Role in Mutagen Sensitivity. En: Carcinogénesis. Vol. 23 (2002); p, 1003-1008.

VIDAL, A *et al.* XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic sites repair through protein-protein interactions. En: EMBO Journal. Vol. 20 (2001); p, 6530-6539.

VITALI M. *et al.* Exposure to Organic Solvents among Handicraft Car Painters: A Pilot Study in Italy. En: Industrial Health. Vol.44 (2006), p, 310-317.

VODICKA, P and HEMMINKI, K. Identification of alquilation products of styrene oxide in single- and double-stranded DNA. En: Carcinogenesis. Vol. 9 (1988), p, 1657-1660.

WANG, Y *et al.* From genotype to phenotype: Correlating XRCC1 polymorphism with mutagen sensitivity. En: DNA Repair. Vol. 2 (2003); p, 901-908.

WEI Z. *et al.*. Detecting DNA Repair capacity of peripheral lymphocytes from cancer patients with UVC challenge test and bleomycin challenge test. En: Mutagenesis. Vol.20 (2005), p, 271-277.

WHITEHOUSE, C. *et al.* XRCC1 simulates human polinucleotid kinasa activity at damage DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. En: Cell. Vol. 104 (2001); p, 107-117.

WHO. Environmental Health Criteria 52: Toluene. En: World Health Organization, Geneva (1986).

_____. Environmental Health Criteria 150: Benzene En: World Health Organization, Geneva. (1993).

_____. Environmental Health Criteria 190: Xylenes. En: World Health Organization, Geneva, (1997).

WILSON, V *et al.* Oncogenic base substitution mutation frequencies in circulating leukocytes of normal individuals. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Submitted, 1999. Citado por: Au. W *et al.* Biomarker monitoring for health risk based on sensitivity to environmental mutagens. En: Environmental Health. Vol. 16 (2001); p,41-64.

WORMHOUDT, L; COMMANDEUR, J. and VERMEULEN, N. Genetic polymorphism of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, Glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. En: Critical Rev. Toxicology. Vol. 29 (1999); p, 59-124.

ZDZIENICKA, M. *et al.* A chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high levels of sister chromatids exchange. En: Mutagenesis. Vol. 7 (1992); p, 265-269.

ZHANG, L *et al.* Benzene increases aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence in situ hybridization in interphase and metaphase cells. En: Environmental Molecular Mutagenesis. Vol. 34 (1999); p, 260-268.

_____. L.; EASTMOND, D. and SMITH, M. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. En: Crit. Rev. Toxicol. Vol. 32 (2002), p, 1-42.

ZHENG Y. *et al.* Bleomycin-induced chromosome breaks as a risk marker for lung cancer: a case-control study with population and hospital controls, Carcinogenesis. Vol. 24 (2003), p, 269-274.

ANEXOS

Anexo A

El grupo de investigaciones en Toxicología Genética y Citogenética requiere de su voluntaria colaboración para conformar un grupo para el estudio **“EFICIENCIA DE REPARACIÓN DE LESIONES EN EL ADN Y SU ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN XRCC1 EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA A SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA”**. Por favor llenar esta corta encuesta y en caso de que usted sea seleccionado lo contactaremos.

**La información que usted suministrará en esta encuesta es
ABSOLUTAMENTE CONFIDENCIAL**

Nombre: _____

Empresa: _____ Dirección: _____ Teléfono: _____

Edad: _____ Años Sexo: F _____ M _____

Dirección (casa): _____ Teléfono (casa): _____

Número de años que lleva trabajando con pinturas y solventes _____

Fuma cigarrillo: Si _____ No _____

Número de años que lleva consumiendo cigarrillos: _____

Número de cigarrillo que consume al día: _____

Ha tenido enfermedades como hepatitis: Si _____ No _____

Actualmente recibe tratamientos con medicamentos por largo periodo de tiempo:

Si _____ No _____

Consumo drogas psicoactivas (Basuco, morfina, heroína, etc.) Si _____ No _____

Cuales _____

Ha sido irradiado: Si _____ No _____

Cuando: _____

Problemas de salud: _____

AGRADECEMOS SU VALIOSA COLABORACIÓN

ENTREVISTA



Codigo			

Por favor responder a las siguientes preguntas en forma sincera, clara y concreta

Encuestador: _____

I. INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre Completo:				Empresa:					
Dirección Empresa:				Casa:					
Teléfono Empresa:				Casa:					
Edad (años)			Sexo	1. M	2. F	Estado civil:	1. Soltero	2. Casado	3. Otro
Grupo	1. Expuesto		Años		2. No Expuesto	Años			
Oficio Actual	1. Entonador		Años		2. Pintor de Carros	Años			
Nivel de educación	Primaria		Secundaria		Universitaria	Ventilación			

II. INFORMACIÓN SOBRE ESTADO DE SALUD

¿Ha tenido problemas de Salud?	Si	No						
Enfermedad	Si	No	Tto	Enfermedad	Si	No	Tipo	
1. Hepatitis			A	B	C	3. Herpes	Labial	Genital
2. Meningitis						4. Cáncer		
Otras ¿Cuáles?								

¿Consume Algún tipo de Medicamento?	Si	No		
Medicamento	Si	No	Dosis	Tiempo (dd/mm/aa)
Otros ¿Cuáles?				

Tratamientos por Enfermedad

¿Ha tenido enfermedades que no han requerido hospitalización?

Enfermedad	Si	No	Tipo de Tto

¿Ha tenido enfermedades que han requerido hospitalización?

Enfermedad	Si	No	Tipo de Tto

¿En su familia existen problemas de Salud? (Papa, Mamá, Hijos, Hermanos, Tios, Tias, Sobrinos)

Trastorno	Descripción				
1. Malformaciones de Nacimiento	Parentesco	No	Si	# Casos	Tipo
	Papá				
	Mamá				
	Hermano (a)				
	Tío (a)				
	Sobrino (a)				
2. Retraso mental	Parentesco	No	Si	# Casos	Tipo
	Papá				
	Mamá				
	Hermano (a)				
	Tío (a)				
	Sobrino (a)				
3. Mongolismo o Síndrome de Down	Parentesco	No	Si	# Casos	Tipo
	Papá				
	Mamá				
	Hermano (a)		78		
	Tío (a)				
	Sobrino (a)				

4. Abortos espontáneos/nacimientos de un niño muerto, partos prematuros	Parentesco	No	Si	# Casos		Tipo
	Papá					
	Mamá					
	Hermano (a)					
	Tío (a)					
5. Esterilidad	Parentesco	No	Si	# Casos		Tipo
	Papá					
	Mamá					
	Hermano (a)					
	Tío (a)					
	Sobrino (a)					

Manifestaciones en el Sistema Nervioso

Tipo	Si	No	Sint. Actual
Fatiga			
Convulsiones			
Alucinaciones			
Delirios			
Incoordinación			

Tipo	Si	No	Sint. Actual
Trastornos del equilibrio			
Astenia			
Somnolencia			
Sordera			

III. INFORMACIÓN SOBRE EL HABITO DE FUMAR ACTUAL

Consumo/cigarrillo	Si	No	Cigarrillos/día						Meses Fumando	Meses sin Fumar	Observaciones
			<10	10 - 20	20-40	40-60	>60	No sabe			
1. Fumador											
2. Ex - fumador											
3. No Fumador											

IV. INFORMACIÓN SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL

Tipo	Si	No	Días/semana	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. Extasis								
7. Otras								

VI. ANTECEDENTES LABORALES

Factor	Si	No	Fuente		Meses	Observaciones
1. Asbestos			1.1 Minería del asbesto			
			1.2 Minería del carbón o el tabaco			
			1.3 Producción de materiales aislantes (tuberías, sábanas, prendas textiles, máscaras, resinas de poliéster, manufactura Uralita)			
			1.4 Astilleros y Arsenales			
			1.5 Producción de frenos para vehículos			
			1.6 Preparaciones dentales y farmacéuticas			
2. Radiaciones Ionizantes			2.1 Fuentes radiactivas (cobalto-68, Iridio-192, Ce			
			2.2 Maquinas y equipos productores de rayos X			
3. Agroquímicos - Plaguicidas			3.1 Insecticidas	Clase/tipo:		
			3.2 Herbicidas	Clase/tipo:		
			3.3 Fungicidas	Clase/tipo:		
			3.4 Raticidas	Clase/tipo:		
4. Colorantes			Clase:			
5. Químicos Industriales			4.1 Gasolina	Actual	Anterior	
			4.2 Kerosén			
			4.3 Nafta			
			4.4 Xilol			
			4.5 Benceno			
			4.6 Xileno			
			4.7 Toluenos			
			4.8 Metanol			
			4.9 Thinner 016			
			4.10 Thinner 014			
			4.11 Thinner 063			
			4.12 Thinner corriente			
			4.13 Thinner Extra-fino			
			4.14 Otro			

