

**INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN
8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h) Y EL FACTOR DE
EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN
PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES
ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

**MARIA VIRGINIA BURBANO AVILA
JULIAN OVIDIO CUCUÑAME BALCAZAR**

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

**INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN
8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h) Y EL FACTOR DE
EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN
PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES
ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

**MARIA VIRGINIA BURBANO AVILA
JULIAN OVIDIO CUCUÑAME BALCAZAR**

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

**DIRECTORA
LUZ STELLA HOYOS GIRALDO. Mg.**

**ASESOR
SILVIO MARINO CARVAJAL. Mg.**

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

Nota de aceptación

Directora Magister Luz Stella Hoyos Giraldo

Jurado PhD Noelia Cajas Salazar

Jurado Magister Edna Lourdes Orozco C.

Popayán Cauca, fecha de sustentación 20 de octubre de 2008

Dedicado A:

Dios que me ha bendecido, dándome la vida, demostrándome a cada instante que cada paso que doy esta guiado e iluminado por él. Ha sido mi padre celestial, mi amigo inseparable y el ser supremo que me enaltece cada vez que me demuestra su amor en grandes y pequeñas cosas; él que me ha dado una familia llena de amor, solidaria y unida. Él que perdona y olvida mis errores para que yo siga triunfando con mis virtudes, a él que me ha permitido disfrutar cada momento de mi carrera, que me dio la fuerza para superar mis quebrantos de salud, porque se encargó de rodearme de seres humanos íntegros que siempre aportaron amor, compañía y tolerancia a mi vida.

A mi Madre, que no tengo las palabras de mi inmensa gratitud, que intenté siempre seguir sus buenos pasos, porque guiada por Dios en el largo proceso de mi formación se que seguirá apoyándome para tomar las mejores decisiones de mi vida, ella que no se ha rendido nunca a pesar de los tropiezos y ha tenido el valor de llevarme de su mano hacia mi propio futuro lleno de bendiciones y de cosas positivas, pero sobretodo del inmenso amor que siempre me ha transmitido para darme seguridad y valentía. A ti mamita querida te obsequio todo lo que soy y seré siempre. A mi Padre, quien me enseñó que las cosas que son para uno son para uno y aquellas que se escapan de las manos te llenan de fuerza y coraje para seguir adelante; a él que puso su granito de arena para darme la oportunidad de nacer y vivir, lo he llevado siempre en mi corazón y mi recuerdo, hoy quiero darle una razón mas para sentirse orgulloso de mi y de mis metas alcanzadas, que con su apoyo fueron posibles.

A mis hermanos Juan y Camilo, que han compartido las tristezas y alegrías de cada momento de mi vida, que han sido mi luz y apoyo incondicional, que se enorgullecen de mi con cada paso que doy y seguros del inmenso amor que les tengo, porque con ellos hemos sido como uno sólo, amigos inseparables y porque luchamos cada día por mantener nuestras almas unidas para siempre, les doy infinitas gracias por su amor, ternura y comprensión. A mi abuelita Lola, que desde los cielos sé que se siente orgullosa de lo que hoy he logrado, por su cuidado y amor que mientras estuvo conmigo me brindó, a ti que estas en los cielos mas cerquita de Dios sigue iluminando mi camino que junto a él he construido. A mi tío Rubén porque ha sido un gran apoyo en este caminar, él que llenó los vacíos que la ausencia de mi padre dejó, que estuvo ahí cuando mis hermanos, mi madre y yo lo necesitamos, darle las gracias y regalarle un pedacito de mi vida para que se siga sintiendo orgulloso de mí; a mi tía Gloria, mis primas Danna, Andrea y Diana, que me han apoyado siempre y han sonreído con mis alegrías, les he dado mi fuerza y ellas su inmenso amor.

A Ruth y mi hermano Javier Fernando, por que me han fortalecido con su apoyo y amor, por estar pendientes de cada paso que doy, a ellos dos, que han significado mucho en mi vida, mil gracias por estar ahí siempre, Dios los bendiga. Gracias a Carlitos y Aydé por su apoyo incondicional risas y alegrías para acompañarme en momentos como este.

María Virginia Burbano Ávila

Dedicado A:

Dios por permitirme culminar con éxito este trabajo, por mantenerme siempre saludable y dispuesto a aprender, por mostrarme que la mejor forma de agradecerle es sirviendo a la comunidad, por darme una familia maravillosa y por poner en mi camino personas excepcionales que han enriquecido mi vida en todos los aspectos.

A mi Madre, por su amor, preocupación dedicación y ternura, porque ella siempre estuvo a mi lado guiándome, mostrando una valentía enorme ante la adversidad, madre querida, madre mía, tus lagrimas, tus bendiciones y tu sufrimiento en la búsqueda por hacer de tu hijo un gran hombre hoy empiezan a verse recompensadas. Gracias ¡Mamita!

A mi Padre, porque ni la enfermedad ni la adversidad han sido capaces de amilantar tu corazón y siempre con mucho amor me ha brindado su apoyo incondicional, motivándome a seguir adelante, por que con su vida ejemplar me ha guiado incesantemente instituyendo en mi los valores éticos y morales como preceptos que deben regir mi vida.

A mi Hermano por ser mi cómplice y amigo, por que con su alegría nunca me ha dejado de alentar para conseguir mis metas y porque siempre ha estado dispuesto a ayudarme.

A mi Novia por ser la consorte de mi alma en esta lucha, por ser una persona integra, amorosa y leal que en los momentos más difíciles de mi vida siempre me impulso para nunca desfallecer, su entrega, infinito amor, comprensión y ternura han sido fundamentales en el éxito conseguido. Nena linda sin ti nada de esto habría sido posible gracias por amarme y estar siempre allí, gracias por cambiar mi destino.

A mi abuela Julia por creer siempre en mí, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, a doña Tere por su amor y por todos los sacrificios que realizó para poder ayudarme.

Julián Ovidio Cucuñame Balcázar

¡Mil gracias!

A mi compañero, novio y amigo por su inmenso amor que me demuestra cada día, por trabajar junto a mí de igual a igual, que me ha brindado la seguridad y la fuerza que he necesitado en los momentos mas difíciles de mi carrera y que creí que no había salida, a él porque juntos hemos construido grandes cosas y logrado muchas más. Gracias por tu amor incondicional.

A nuestra directora, quien nos permitió explorar nuestros conocimientos, que fue y seguirá siendo un ser muy importante para alcanzar nuestras metas, agradecerle por darnos la oportunidad de descubrir que existen caminos difíciles, pero que vale la pena arriesgarse cuando uno los quiere, porque ella con su ingenio y tenacidad nos guió hacia el camino del éxito, que con sus conocimientos, consejos y su apoyo incondicional ha buscado siempre para nosotros la excelencia, mil y mil gracias profe Luz.

A nuestros compañeros del programa de Biología especialmente a mi compañera Sandra Gómez que fue mi gran apoyo en mi carrera, que junto a ella compartimos muchas cosas que hicieron agradable mi paso por la Universidad.

A los demás compañeros de énfasis y laboratorio por llenar nuestras vidas de anécdotas que recordaremos siempre con mucha alegría y gratitud; a Jonatán y Dayana, que nos animaron a no desfallecer, y que con sus consejos nos alegraron para hacer nuestro camino mas fácil de recorrer, a Julián Valencia y Andrea Prado, por su ánimo y compañía, en las duras fases de nuestro trabajo, agradecerles por su paciencia y tolerancia que nos transmitieron para seguir adelante.

A nuestro asesor Silvio Carvajal por toda su ayuda y empeño. A Adriana, Luis, Ingrid y Elsa "Lulú", por compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación para fortalecer nuestra formación integral como profesionales, que nos brindaron su amistad incondicional para hacernos sentir cómodos y seguros del trabajo que estábamos desarrollando, agradecerles por su gran experiencia y permitirnos aprender de ella, infinitas gracias y regalarles la alegría que con su ayuda hicieron posible.

A nuestros profesores, compañeros de carrera, familiares, y amigos: Nicolás, John Jairo, Pablo, Cesar, Daniel, Robín, Santiago, Sebastián, Catherine, por su compañía y apoyo. A mis amigas inseparables del Colegio, Paola, Norma, Maritza y Carol; agradecerles los momentos de alegría y felicidad que han compartido desde el día que la vida nos obsequio nuestra amistad incondicional.

Ma. Virginia y Julián

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
2 HIPÓTESIS	20
3 JUSTIFICACIÓN	21
4 OBJETIVOS	23
4.1 GENERAL	23
4.2 ESPECÍFICOS	23
5 MARCO REFERENCIAL	24
5.1 SOLVENTES ORGÁNICOS	24
5.1.1 El Tíner.	24
5.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y LESIONES EN EL ADN	27
5.3 REPARACIÓN DE LESIONES EN EL ADN	28

5.3.1	Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases.	28
5.4	GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h)	30
5.4.1	Organización y Estructura del Gen OGG1h.	31
5.4.2	Actividad Glicosilasa/AP Liasa del Gen OGG1.	33
5.5	POLIMORFISMO GENÉTICO.	35
5.6	POLIMORFISMO DEL GEN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h)	36
5.6.1	Polimorfismo del Gen OGG1h, Susceptibilidad Genética y Riesgo de Cáncer.	37
5.7	MONITOREO BIOLÓGICO	38
5.8	BIOMARCADORES	38
5.8.1	Biomarcadores de exposición.	40
5.8.2	Biomarcadores de efecto.	40
5.8.3	Biomarcador de susceptibilidad.	40
5.9	AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR Y POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's).	41
5.10	PRUEBA CITOGÉNÉTICA DE MICRONÚCLEOS (MN).	42
5.10.1	Definición.	42

5.10.2	Principio de la prueba.	42
5.10.3	Significancia Biológica.	42
5.10.4	Prueba de MN con bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica.	43
5.10.5	Ventajas de la prueba.	45
5.10.6	Validación de la prueba de MN.	45
5.11	MICRONÚCLEOS Y RIESGO DE CÁNCER	47
5.12	EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN EL BIOMONITOREO HUMANO	47
6	ANTECEDENTES	49
6.1	BIOMONITOREO DE POBLACIONES EXPUESTAS A SOLVENTES ORGÁNICOS	49
6.2	POLIMORFISMO DEL GEN OGG1h, FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y POBLACIONES EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE	50
6.3	ACTIVIDAD DEL GEN OGG1h Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER Y OTRAS ENFERMEDADES DEGENERATIVAS	51
7	METODOLOGÍA	53
7.1	TIPO DE ESTUDIO	53
7.2	POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	53
7.3	CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.	54

7.4	GRUPOS DE ESTUDIO	54
7.5	TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE	54
7.6	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS Y EXTRACCIÓN DE ADN	55
7.7	ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR Y DE LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS POR RFLP'S	55
7.8	GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h).	56
7.9	PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE CITOCINESIS	57
7.10	PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
8	RESULTADOS	60
8.1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.	60
8.2	GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 (OGG1H) EN HUMANOS, EN LA POBLACION OBJETO DE ESTUDIO	60
8.3	FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	62
8.4	INTERACCIÓN ENTRE GENOTIPOS, FENOTIPOS DEL GEN OGG1h Y LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.	63

8.5	ASOCIACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS, LA EDAD Y EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN	64
8.6	INTERACCIÓN ENTRE EL CONSUMO DE ALCOHOL Y LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN LA POBLACION OBJETO DE ESTUDIO.	65
9	DISCUSIONES	66
10	CONCLUSIONES	73
11	PERSPECTIVAS	75
12	IMPACTO	76
	BIBLIOGRAFÍA	77

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Sistema de Reparación por Excisión de Bases (BER), y sus dos rutas alternas	29
Figura 2. Localización cromosómica del gen OGG1h determinado por FISH (a) Señales de hibridación en el cromosoma 3 (b) Ideograma del cromosoma 3 donde se observa la localización del gen OGG1h en 3p25	30
Figura 3. Expresión del gen OGG1 en diferentes tejidos humanos	31
Figura 4. Organización genómica del gen OGG1h	32
Figura 5. Doble función de la ADN Glicosilasa OGG1h actuando también como AP liasa.	33
Figura 6. Actividad de la ADN Glicosilasa OGG1h y su actividad AP liasa en relación con las rupturas de cadena sencilla	34
Figura 7. Patrón de bandas de las variantes alélicas del gen OGG1h	36
Figura 8 Formación de micronúcleos y replicación del ADN	43
Figura 9. Expresión de los micronúcleos (MN) de linfocitos en división en cultivos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	44
Figura 10. Protocolo prueba de micronúcleos (MN)	17
Figura 11. Productos amplificados por PCR y RFLPs del gen OGG1h	61

Figura 12. Distribución de genotipos en la población objeto de estudio	61
Figura 13. Fotografías de células binucleadas con daño genético	63
Figura 14. Correlación cuadrática entre la frecuencia de micronúcleos y el tiempo de exposición	64

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación química de los solventes orgánicos	24
Tabla 2 Componentes del tiner según ECOPETROL	25
Tabla 3 OGG1h codón 326 exón 7	36
Tabla 4 Criterios definidos por el <i>HUman MicroNucleus Project</i> (HUMN) para la selección de células binucleadas y de micronúcleos en cultivos de células humanas	46
Tabla 5 Relación de estudios que involucran el polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h	52
Tabla 6 Descripción de variables del estudio	53
Tabla 7 Características de la población objeto de estudio	60
Tabla 8 Distribución del genotipo en la población objeto de estudio	61
Tabla 9 Interacción entre el grupo de estudio, consumo de alcohol y la frecuencia de micronúcleos	62
Tabla 10. Frecuencia de micronúcleos respecto al los grupos de estudio	62
Tabla 11. Frecuencia de micronúcleos respecto al genotipo y grupos de estudio	63
Tabla 12. Interacción entre el grupo de estudio, consumo de alcohol y la frecuencia de micronúcleos	65

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Encuesta Corta	88
Anexo B Encuesta Larga	89
Anexo C Consentimiento informado	91
Anexo D Condiciones de PCR y RFLP's y tabla de registro para la genotipificación del polimorfismo del gen OGG1h	93
Anexo E Tabla de registro de micronúcleos	94

RESUMEN

Introducción. La exposición de origen ocupacional a solventes orgánicos en el departamento del Cauca es una problemática de salud pública, principalmente en el sector informal que labora en la pintura de automotores; el poco conocimiento del daño que puede causar la exposición a estos químicos y el escaso o casi nulo uso de las medidas de bioseguridad, posibilita aún más la utilización de estos químicos afectando la salud del trabajador. Existen indicadores biológicos que permiten estimar riesgo de enfermedad o muerte del individuo expuesto como el biomarcador de efecto micronúcleos (MN), el incremento de la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica está asociada con el riesgo de desarrollar cáncer, validando su uso para identificar daño cromosómico e inestabilidad genómica; de igual manera los biomarcadores de susceptibilidad nos permiten identificar las variantes genéticas de los individuos, para la predicción y prevención temprana de enfermedades. La exposición crónica a solventes orgánicos, aumenta el estrés oxidativo celular del individuo expuesto, aumentando a su vez la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al interior de la célula, el gen OGG1h juega un papel crítico en la reparación de varios tipos de lesiones oxidativas del ADN, especialmente la lesión 8 oxoguanina (8-OxoG). **Objetivo.** Establecer la interacción entre el polimorfismo del gen OGG1h y el factor de exposición, con relación a la frecuencia de micronúcleos, en una población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos. **Metodología.** El estudio es de tipo transversal, con una población de 100 individuos (50 expuestos y 50 referentes), los grupos fueron apareados por edad y sexo. Cada individuo firmó un consentimiento informado para la posterior toma de muestra de sangre. La frecuencia de MN se identificó con el bloqueo de la citocinesis y la identificación del genotipo del gen OGG1h se realizó mediante el desarrollo de PCR y RFLP's. **Resultados.** El presente estudio mostró una distribución genotípica del 63% para Ser-Ser, 32% para Ser-Cis y 5% para Cis-Cis. El grupo expuesto presentó una frecuencia de micronúcleos estadísticamente significativa ($2.67 \pm (0,717)$) frente al encontrado en el grupo referente ($1.47 \pm (0,532)$) ($p=0.008$); no se observó interacción entre el genotipo y los grupos de estudio frente a la frecuencia de micronúcleos ($p=0,551$). **Discusión.** La exposición ocupacional a solventes orgánicos es una de las principales causas del incremento en la frecuencia de micronúcleos del grupo expuesto, sin embargo y pese a la importancia biológica del polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h no es posible observar una interacción estadísticamente significativa entre la frecuencia de micronúcleos, el genotipo ($p=0,403$) y/o fenotipo ($p=0.535$) de la población objeto de estudio. **Conclusión.** El incremento en la frecuencia de MN esta relacionada con la exposición a solventes orgánicos en la población objeto de estudio, no se observó que el polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h, influya en la frecuencia de micronúcleos en los individuos del grupo expuesto y el grupo referente.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un creciente interés en desarrollar diferentes investigaciones que permitan determinar los factores de riesgo que causan los altos índices de morbi-mortalidad en países desarrollados y en vía de desarrollo. Es necesario realizar investigaciones tendientes a prevenir problemas de salud en los individuos de una población y que además permitan identificar la secuencia de eventos biológicos que empiezan con la exposición a sustancias potencialmente peligrosas y finaliza con la enfermedad o muerte del individuo expuesto. Este es uno de los grandes desafíos de la investigación epidemiológica moderna, comprender su secuencia, nos permitiría tomar medidas a tiempo para prevenir el desarrollo de la enfermedad, ya sea al alterar su curso ó al detectar exposiciones a un compuesto químico, incluidos aquellos que se hallan en mezclas [1].

El uso indiscriminado de químicos como los solventes orgánicos y pinturas sintéticas es una problemática de salud ocupacional; el desconocimiento del daño causado por la exposición a estos químicos y al mal manejo de quienes los utilizan, ha incrementado los daños que afectan la salud del trabajador. Para mejorar esta problemática se han desarrollado biomarcadores que son usados ampliamente en diferentes investigaciones y los cuales permiten predecir eventos perjudiciales tempranos sobre la salud que conllevan a enfermedad o muerte, dentro de ellos están los biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad; que han permitido evaluar los efectos de químicos genotóxicos y así identificar los grupos susceptibles a daño cromosómico [2].

Se han realizado diferentes estudios bioquímicos sobre los efectos de los solventes orgánicos como el benceno, tolueno y sus metabolitos, demostrando que estos pueden provocar daño oxidativo en el ADN [3]. Se conoce que la exposición constante a solventes orgánicos como el tñner, aumenta el estrés oxidativo celular del individuo expuesto, aumentando a su vez la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al interior de la célula, estas ROS pueden interactuar con el ADN causando diferentes tipos de daño; para ello la célula cuenta con una compleja maquinaria que se encarga de la reparación de los daños causados al interior de ella, trabajando en diferentes rutas que son determinadas por el tipo de daño y la fase celular en que ocurre; entre los mecanismos de reparación se encuentra la Reparación por escisión de Bases (BER), el cual puede ser activado por diferentes estímulos endógenos o exógenos.

El mecanismo BER repara principalmente el daño oxidativo; como el causado por la exposición a solventes orgánicos esta ruta de reparación involucra un gran número de enzimas codificadas por diferentes genes de reparación, como el gen 8-oxoguanina glicosilasa 1 (OGG1) que codifica para una glicosilasa bífuncional

con actividad glicosilasa y AP liasa de reconocimiento y escisión del daño. Múltiples estudios funcionales han demostrado claramente que el gen 8 oxoguanina glicosilasa 1 en humanos (OGG1h), juega un papel importante en la reparación de varios tipos de modificaciones de bases del ADN, especialmente la lesiones 8 oxoguanina (8-O-G) y 8 hidroxiguanina (8.OH)[4].

Estudios recientes han demostrado que los polimorfismos en genes del metabolismo de xenobióticos y genes de la reparación del ADN, están asociados con el desarrollo del cáncer [5], además existen variantes significativas en la respuesta a agentes ambientales mutagénicos y al posterior desarrollo de problemas de salud como el cáncer. Sin embargo, muchos factores pueden contribuir a dichas variaciones, entender y conocer las bases genéticas de dichas variaciones, permite predecir problemas de la salud humana y prevenir de manera efectiva la enfermedad [6].

Es así como surge el interés de analizar el polimorfismo del gen OGG1h involucrado en la reparación del daño oxidativo, ocasionado por la interacción entre las especies reactivas de oxígeno (producto del metabolismo de los solventes orgánicos) y el ADN; reflejándose en lesiones que pueden inducir rupturas de cadena sencilla. Sí, la eficiencia de reparación del ADN está determinada por el estado del gen OGG1h, se observará una variable polimórfica desfavorable que no permitirá la reparación correcta de la enzima, de tal manera que esa ruptura de cadena sencilla se replicaría durante la síntesis de ADN en una ruptura de cadena doble, que podrá observarse como micronúcleo. La frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica es un biomarcador predictor de riesgo de cáncer validado en el año 2007, que evalúa daño cromosómico en poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos, además permite identificar la susceptibilidad genética de la población y de esta manera prevenir o controlar el desarrollo de enfermedades e incremento del riesgo de cáncer [7].

Para el desarrollo de este estudio se motivó a la participación de forma voluntaria de la población, se realizó una encuesta donde se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión para la selección del grupo expuesto y el referente; a la población seleccionada se le aplicó una encuesta completa para obtener las características de cada individuo, posteriormente se realizó la firma del consentimiento informado que contenía las características del estudio; y finalmente se tomaron dos muestras de sangre periférica para la extracción de ADN e identificación del polimorfismo del gen OGG1h por PCR y RFLPs; y se establecieron cultivos para el desarrollo de la prueba citogenética de micronúcleos y la identificación de su frecuencia.

El objetivo de este estudio fue, establecer la interacción entre el polimorfismo del gen de reparación 8-Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) y el factor de exposición, con relación a la frecuencia de micronúcleos en personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos, en el Departamento del Cauca.

1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo en su mayoría por exposición ocupacional a agentes mutagénicos y carcinogénicos [8], según la Oficina Internacional del Trabajo (OIT) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2007) [9] las enfermedades de tipo ocupacional causan anualmente 1,7 millones de muertes al año. Investigaciones realizadas en la década de los 80 mostraron que entre el 23-38% de la mortalidad, se relacionan con causas de tipo ocupacional [10]. En la actualidad, en el mundo se estima que entre el 5 y 15% de las muertes por cáncer ocurre en hombres y entre el 1-5% en mujeres, que son atribuidas a factores ocupacionales. En los países desarrollados del 6%-10% de las muertes causadas por cáncer son de origen ocupacional [11], en Colombia se han identificado alrededor de 2.500 casos de enfermedad de origen ocupacional por año, se estima que el 40% eran enfermedades crónicas o degenerativas, y el 1% de estas enfermedades podían causar muerte prematura. Las estadísticas de cáncer de origen ocupacional en nuestro país son deficientes, según un informe de la dirección de riesgos profesionales del Ministerio de Protección Social, entre los años 2003 y 2005 sólo se reportó un caso de cáncer de origen ocupacional [12].

Una de las labores que presenta mayor riesgo para el trabajador es el oficio de pintor, por encontrarse expuesto a sustancias como los solventes orgánicos, según la IARC diferentes estudios epidemiológicos realizados en pintores han determinado que esta ocupación esta asociada con un significativo incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón y de vejiga, otros estudios realizados en pintores han demostrado que existe un incremento en los niveles de daño cromosómico en estas personas [13]. Estimaciones hechas por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (*Nacional Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) [10] en Estados Unidos sobre exposición a solventes orgánicos, ha reportado que un gran número de trabajadores se encuentran expuestos a solventes como el tolueno y el xileno [14].

La exposición a solventes orgánicos y sus efectos es un problema de Salud Pública, sin embargo no se ha identificado hasta el momento el agente específico responsable [15]. Según Del Castillo [16] la exposición constante a solventes orgánicos, ha manifestado un efecto neurotóxico ligado al tiempo de exposición, siendo probado por el déficit de las funciones cognitivas como atención, percepción, memoria y coordinación psicomotora del individuo expuesto, además Piscoya [17] menciona que el tolueno es el componente mas frecuente que forma parte de mezclas de solventes orgánicos como el tiner y es el principal causante de asma bronquial relacionada con la ocupación, también plantea que los hidrocarburos no saturados de la serie del benceno son causantes de

enfermedades como el cáncer; la exposición prolongada a benceno en trabajadores aumenta el riesgo a desarrollar leucemia de 5 a 10 veces en comparación con trabajadores no expuestos.

Los trabajadores del sector informal de pintura de automotores en nuestro país y específicamente en el departamento del Cauca, se encuentran expuestos constantemente a agentes químicos como los solventes orgánicos, sin una adecuada protección para su manejo. Es claro que la composición de los solventes los hace altamente volátiles y de fácil transporte a través de la membrana lipídica, lo que permite el aumento de los niveles de absorción de estos por vía dérmica o por inhalación del trabajador expuesto; causando a su vez el aumento del estrés oxidativo al interior de la célula, lo que resulta en la acumulación de lesiones primarias como: oxidación de bases, sitiosapurínicos y rupturas de cadena sencilla; que serán reparados por mecanismos enzimáticos, si estos mecanismos son ineficientes las lesiones no serán reparadas y en el momento de la replicación del ADN, se expresarán en una mutación, que se conoce como el evento inicial de la carcinogénesis y otras enfermedades [18]

La exposición ocupacional a químicos y la susceptibilidad genética del individuo, determinada por las variantes de genotipos heredados, están altamente relacionadas con el desarrollo de la enfermedad [5], es claro que el ambiente de trabajo y los factores genéticos individuales repercuten en la salud del trabajador entendiéndose como salud “al completo estado de bienestar físico, social y mental de los individuos y no sólo la ausencia de enfermedades” [19]. Sin embargo, no existen suficientes estudios que analicen los efectos genotóxicos de los solventes orgánicos y su relación con la variabilidad genética individual del trabajador; aportando fundamentos para la optimización de las políticas y programas de promoción de la salud y prevención de la enfermedad y que además permitan crear estados de conciencia en el trabajador, sobre el daño que puede ocasionar la exposición a estas sustancias.

Este estudio responderá a los siguientes interrogantes. ¿Cuales son las frecuencias genotípicas y fenotípicas para el gen de reparación 8 Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) en la población objeto de estudio?, ¿presenta la población expuesta a solventes orgánicos una mayor frecuencia de micronúcleos que la población referente?, ¿Existe interacción entre los genotipos del gen OGG1h y el factor de exposición, con relación a la frecuencia de micronúcleos de la población objeto de estudio?

2 HIPÓTESIS

Si el polimorfismo del gen 8 oxoguanina glicosilasa 1 en humanos (OGG1h), modula la respuesta biológica en la reparación del daño causado por la exposición ocupacional a solventes orgánicos, se espera que haya una interacción significativa entre el factor exposición y el genotipo, de tal manera que en los individuos expuestos y con genotipo favorable la frecuencia de micronúcleos será significativamente menor que la frecuencia registrada para los individuos con genotipo desfavorable. (*Hi*) de lo contrario la interacción no será significativa. (*Ho*)

Si la exposición a solventes orgánicos produce efecto genotóxico y citotóxico se espera observar, un incremento de la frecuencia de micronúcleos en personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos, con relación al grupo referente (*Hi*); de lo contrario la frecuencia de micronúcleos en personas expuestas ocupacionalmente y grupo referente no presentarán diferencia significativa (*Ho*).

3 JUSTIFICACIÓN

Los procesos de industrialización en los países en vía de desarrollo, hace que cada vez haya mayor exposición humana a diferentes agentes tóxicos. En el departamento del Cauca existe un gran número de personas que laboran en talleres de pintura de automotores, que están constantemente expuestos a diferentes clases de solventes orgánicos, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [9], la exposición a estos hidrocarburos aromáticos policíclicos es la principal causa de diferentes enfermedades del sistema nervioso central en personas expuestas, de igual manera la IARC [13] estableció que la labor de pintor esta relacionada con el riesgo a desarrollar cáncer. Es evidente que el mayor número de investigaciones se han centrado en identificar los efectos neurotóxicos de la exposición, es así como la literatura reporta pocos estudios que relacionen exposición, variabilidad genética y efecto genotóxico, esto hace pertinente el desarrollo de investigaciones que contengan estos aspectos.

Uno de los solventes orgánicos mas utilizado por los pintores del Cauca es el tiner, esta es una mezcla que contiene compuestos como el benceno y el xilol, responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (**Reactive Oxygen Species (ROS)**) al interior de la célula, estas ROS producen daño oxidativo en el ADN que es reparado por la acción de una variedad de enzimas, entre ellas, la proteína 8-oxoguanina glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) codificada por el gen OGG1h (8-oxoguanina glicosilasa 1), enzima con actividad bifuncional ADN glicosilasa/AP liasa, que reconoce y remueve las bases oxidadas [20]. Si la ADN glicosilasa es deficiente en la reparación, el individuo será mas susceptible a sufrir mutaciones en el ADN y por lo tanto aumentará el riesgo a desarrollar cáncer.

Es importante determinar, si el genotipo del individuo expuesto influye, en la acción del mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) sobre el daño causado en el ADN, como consecuencia de la exposición ocupacional a solventes orgánicos. Recientes estudios han relacionado el polimorfismo del gen OGG1h y el riesgo a desarrollar diferentes tipos de enfermedades, tales como: cáncer gástrico, cáncer orolaríngeo, carcinoma hepatocelular, algunas leucemias y pterigio [21-25]; por lo tanto este biomarcador de susceptibilidad es determinante para el estudio, ya que puede ser asociado con un biomarcador de efecto como la prueba de MN, que nos indique el nivel de daño en el ADN causado por la exposición y de esta manera poder establecer el rol del polimorfismo y su modulación en la respuesta biológica en la reparación.

Es claro que las ROS pueden interactuar con el ADN y causar lesiones que pueden inducir rupturas de cadena sencilla, estas rupturas pueden ser reparadas

por la acción de los mecanismos de reparación; si la reparación es deficiente y esta asociada a la actividad de la enzima, que obedece al estado del gen, esta ruptura de cadena sencilla al replicarse el ADN se expresará en ruptura de cadena doble, que podrá observarse mediante la estimulación de la división celular al bloquear la citocinesis, de esta manera se podrá observar el daño cromosómico expresado como micronúcleo en una célula binucleada.

Con base en lo anterior es importante desarrollar ensayos que permitan evaluar genotoxicidad de manera rutinaria para monitorear aquellos individuos que por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones, capaces de modificar su estabilidad genética [26]; de allí surge el interés de utilizar en la investigación el biomarcador de efecto micronúcleos validado en el año 2007 [27], ya que su frecuencia en sangre periférica, es usada extensivamente en epidemiología molecular y citogenética, para evaluar la presencia y grado de daño cromosómico en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos, e identificar riesgo de cáncer [7, 28]

Es muy importante conocer la frecuencia del polimorfismo en la población estudiada, ya que nos permite identificar la variabilidad genética en una población pionera para Colombia.

Se hace relevante evaluar factores de riesgo ambientales, que permitan alertar a la comunidad laboral expuesta. Además se busca contribuir con la ciencia ampliando el número de estudios que permitan confirmar la utilidad de micronúcleos como biomarcador de exposición.

La falta de estudios que relacionen el polimorfismo del gen OGG1h y su capacidad o efectividad de la reparación medida por un biomarcador de efecto como MN, ha sido determinante en el planteamiento de ésta investigación, teniendo en cuenta que todos los individuos no son igualmente susceptibles y la frecuencia de MN puede diferir de un individuo a otro respecto de su variabilidad genética.

4 OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Establecer la interacción entre el polimorfismo del gen de reparación 8-Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) y el factor de exposición, con relación a la frecuencia de micronúcleos en personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos, en el Departamento del Cauca.

4.2 ESPECÍFICOS

Estandarizar la amplificación del ADN por PCR y la genotipificación del gen 8-Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) mediante RFLP's.

Caracterizar el polimorfismo del gen de reparación OGG1h en el grupo expuesto a solventes orgánicos y en el grupo referente.

Establecer las frecuencias genotípicas y fenotípicas del gen OGG1h en la población objeto de estudio.

Identificar y comparar la frecuencia de micronúcleos (MN) en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos y el grupo referente.

Establecer la influencia del polimorfismo del gen OGG1h sobre la frecuencia de micronúcleos en la población objeto de estudio

5 MARCO REFERENCIAL

5.1 SOLVENTES ORGÁNICOS

Los solventes orgánicos en su mayoría están compuestos por hidrocarburos aromáticos policíclicos, estos químicos son ampliamente usados en laboratorios, lavanderías, tipografías y talleres de pinturas, dichos solventes se emplean específicamente como agentes para limpieza, aseo, diluyentes de pinturas, limpiadores, reactivos químicos y agentes deshidratantes; en mayor proporción los trabajadores los utilizan como limpiadores y desgrasadores, de manera que la exposición ocupacional es frecuente, dada las múltiples actividades en las que son requeridos [29].

Tabla 1. Clasificación química de los solventes orgánicos.

Grupo Químico	Nombre de los Solventes
Aromáticos	Benceno*, tolueno, xileno, etilbenceno, estireno
Hidrocarburos	Tricloroetileno, tetracloroetileno, metilcloroformo
Clorinados	(1,1,1-Tricloroetano)
Alcoholes	Alcohol metílico, alcohol isopropílico, alcohol butílico
Éteres	Dietil eter, 1, 4-dioxano
Esteres	Metil acetato, etil acetato, butil acetato
Derivados del Glicol	Etilenglicol (monoetil, monometil, monobutil eter)
Clorofluorocarbonos	Fluorotriclometano (CFC-11), 1, 1, 2- Tr 1 cloro 1,2,2- trifluoroetano (CFC-113)
Misceláneas	n-Hexano, disulfuro de carbono, dimetilformamida

Fuente: Piscoya, J.A., Toxicidad de los solventes como riesgo ocupacional. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna, 2000. 13 (1)

Comúnmente usamos un sinnúmero de solventes (Ver tabla 1), sin conocer que muchos de ellos son mezclas que contienen más de un producto. Entre estas mezclas la más usada es el tñner, compuesta por solventes como: tolueno, alcohol metílico, acetona, hexano, alcohol, xileno y ésteres.

5.1.1 El Tñner. Es un líquido homogéneo, volátil, transparente, formado por una mezcla balanceada de disolventes, diluyentes y cosolventes; que facilitan la

aplicación de los productos, sin afectar su funcionalidad [30], está compuesto principalmente por solventes activos o disolventes, que son líquidos volátiles altamente polares, capaces de disolver la nitrocelulosa y otras resinas sintéticas a cualquier concentración y que son difíciles de ser puestas en solución. En este grupo se encuentran ésteres, cetonas y éteres de glicol. Los de uso más común son: acetato de etilo, acetato de amilo, acetato de propilo, acetona, metil, etil cetona (MEK) y metil isobutil cetona (MIBK) (Ver tabla 2). Los cosolventes, son los no solventes o solventes latentes donde se encuentran los alcoholes, con excepción del metanol, estos no disuelven los grados comerciales de nitrocelulosa. Se utilizan comúnmente el alcohol isopropílico, alcohol n-propílico, isobutanol, n-butanol, alcohol metílico, alcohol amílico y alcohol etílico, en los términos tolerados. Los diluyentes base o soporte, son los hidrocarburos y parafinas, los cuales no tienen ningún poder disolvente sobre algunas resinas sintéticas, pero en cambio disuelven las resinas naturales, casi sin excepción, lo mismo que las resinas maléicas, fenólicas y alquídicas. Como diluyentes son ampliadores de las mezclas de solventes verdaderos y cosolventes, dando ciertas características a las soluciones y principalmente reduciendo los costos en la fabricación del tiner. Estos hidrocarburos miden el poder disolvente y su grado de compatibilidad con las resinas, y pueden controlar propiedades físicas como fluidez, peso específico y contenido de sólidos.

Tabla 2. Componentes del tiner según ECOPETROL, analizadas por cromatografía de gases mediante la prueba del piano

Componentes	Tíner 0.14	Tíner corriente
Tolueno	23.68	1.31
m-xileno	16.87	22.07
p-xileno	6.89	9.20
o-xileno	1.58	2.77
Hexano	12.55	-
2,3 dimetilhexano	7.86	-
Noveno	9.68	-
Isobutano	23.55	-
Octano	4.65	-
Etilbenceno	7.03	-
→ 50 compuestos más con una masa < 1%		

Fuente: tomado de Hoyos 2003, Susceptibilidad genética y efecto genotóxico por exposición ocupacional a solventes orgánicos.

A continuación se mencionan algunas características de los solventes orgánicos mas utilizados:

El benceno: Es una sustancia química ampliamente usada que se origina tanto de procesos naturales como de actividades humanas. La inhalación de benceno puede producir somnolencia, mareo y pérdida del conocimiento. La exposición prolongada produce efectos sobre la médula de los huesos y puede causar anemia y leucemia. El benceno también es un componente natural del petróleo, la gasolina y el humo de cigarrillo [31].

La acetona: Es un compuesto sintético que también ocurre naturalmente en el medio ambiente. Es un líquido incoloro, de olor y sabor fáciles de distinguir. Se evapora fácilmente, es inflamable y es soluble en agua. También se le conoce como dimetil cetona, 2-propanona y beta-cetopropano. La exposición a la acetona ocurre principalmente al respirar aire, tomar agua o al entrar en contacto con productos o suelo que contiene acetona. La exposición a cantidades de acetona moderadas puede irritar los ojos y el sistema respiratorio y puede también producir mareo y a niveles muy altos puede causar pérdida del conocimiento [31].

El tolueno: Se usa en la fabricación de pinturas, diluyentes de pinturas, barniz para las uñas, lacas, adhesivos y gomas, en ciertos procesos de imprenta y curtido de cuero. La exposición al tolueno ocurre al respirar aire contaminado en el trabajo, escape de automóviles y en ciertos productos de consumo. El tolueno afecta al sistema nervioso [31].

El xileno: hay tres formas de xileno en las que la posición de los grupos metilos en el anillo de benceno varía: meta-xileno, orto-xileno y para-xileno (m-, o- y p-xileno). Estas formas se conocen como isómeros. El xileno se usa como disolvente en la imprenta y en las industrias de caucho y cuero. También se usa como agente de limpieza, diluyente de pintura y barnices. Pequeñas cantidades se encuentran en el combustible de aviones y en la gasolina. La exposición al xileno ocurre en el lugar de trabajo y cuando otros productos lo contienen. Las personas que inhalan niveles altos de xileno pueden sufrir mareo, confusión y alteraciones del equilibrio.

El metanol: También conocido como alcohol metílico o alcohol de madera, es el alcohol más sencillo. Es un líquido ligero, incoloro, inflamable y tóxico que se emplea como anticongelante, disolvente y combustible. En concentraciones elevadas el metanol puede causar dolor de cabeza, mareo, náusea, vómitos y muerte. Una exposición aguda, puede causar ceguera o pérdida de la visión. Una exposición crónica, puede causar daño en el hígado o producir cirrosis, así como alteración en la sustancia gris profunda del cerebro (ganglios de la base). El metanol, a pesar de su toxicidad, es muy importante en la fabricación de medicinas.

Estas sustancias químicas se han encontrado en diferentes sitios de la lista de prioridades nacionales identificados por la Agencia de Protección del Medio

Ambiente de Estados Unidos. (EPA), y la ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2005) [31]

Los diluyentes utilizados en el tiner son el tolueno y el xileno, los cuales dan una buena relación de dilución de acuerdo al solvente activo que esté en uso. En la clasificación de estos hidrocarburos, teniendo en cuenta su poder disolvente, se pueden denominar también retardadores, que inciden directamente sobre la velocidad de evaporación, evitando los problemas en la aplicación de pinturas. Contienen dos grupos activos dentro de la molécula (alcohol y éter), los cuales actúan como acopladores para compuestos semejantes. El retardador de más uso en tiner es el butil cellosolve. Por consiguiente, en la formulación de pinturas, es común emplear mezclas de estas clases de líquidos para la utilización de componentes a base de nitrocelulosa, los rangos de porcentajes específicos de estas clases son: 16-22% de disolvente activo; 12-16% de cosolvente; 3 -9% de retardador y 55 -60% de diluyente [30].

El uso constante de los solventes orgánicos y la frecuente exposición ocupacional, pueden producir diversos efectos que van en perjuicio de la calidad de vida de la población trabajadora. En este sentido, los solventes orgánicos han sido relacionados con una serie de trastornos sistémicos, tales como: dermatitis, desórdenes cardiovasculares, linfosarcomas y fetopatías diversas. Estudios previos han demostrado que los trabajadores expuestos a solventes orgánicos desarrollan deficiencias en la visión del color y encefalopatías crónicas. Las investigaciones realizadas en los últimos años se han concentrado en sus efectos neurotóxicos, debido a la afinidad de estas sustancias con el tejido nervioso [32].

5.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y LESIONES EN EL ADN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen el ión peróxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidróxilo ($HO\cdot$); se forman en las células, como producto del metabolismo aeróbico, o como consecuencia de la exposición a mutágenos ambientales y de origen endógeno. Las ROS por radiaciones ionizantes ó radicales libres, atacan al ADN y proteínas, produciendo lesiones primarias tales como: daño oxidativo de bases nitrogenadas, rupturas de cadena sencilla y de cadena doble de ADN, entrecruzamiento de cadenas de ADN y proteínas; éstos radicales se unen a las purinas formando hidroxipurinas, en los carbonos 4, 5 u 8 [33]. Las especies reactivas de oxígeno se originan también por el metabolismo de químicos como los solventes orgánicos, estas especies al acumularse al interior de la célula producen daños que pueden ser reparados por sistemas enzimáticos, los cuales actúan removiendo y reemplazando las secciones del ADN alterado, la no reparación del daño oxidativo del ADN, desencadena procesos de mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento; debido a la

acumulación de mutaciones, que alteran procesos biológicos, tales como: el control del ciclo celular, activación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumor [34, 35].

El daño a causa del estrés oxidativo más estudiado es el 8-OH-G (8-hidroxi guanina) ó el 8-O-G (8-oxoguanina). La guanina es la base nitrogenada más afectada del ADN, por poseer más centros electrofílicos que facilitan su interacción con las especies reactivas de oxígeno [36]; este daño es reparado, por la acción de una variedad de enzimas como la proteína 8-oxoguanina ADN glicosilasa 1 (OGG1) codificada por el gen OGG1 (8-oxoguanina ADN glicosilasa 1), enzima con actividad bifuncional ADN glicosilasa/AP liasa que reconoce y remueve las bases oxidadas [20], presenta actividad catalítica hidrolizando el enlace fosfodiéster en el extremo 3' del sitio apurínico/apirimidínico (AP), si este daño no es reparado por los mecanismos biológicos celulares, se hace altamente mutagénico, estimulando así las transversiones GC a TA [37]. La asociación de estos daños en el ADN de origen endógeno (espontáneo) y exógeno (ambiental), en la iniciación y progresión de neoplasias, es indiscutible. Un gran número de modificaciones causadas por el estrés oxidativo, han sido detectadas en células de mamíferos y se han encontrado altos niveles en células cancerosas[38].

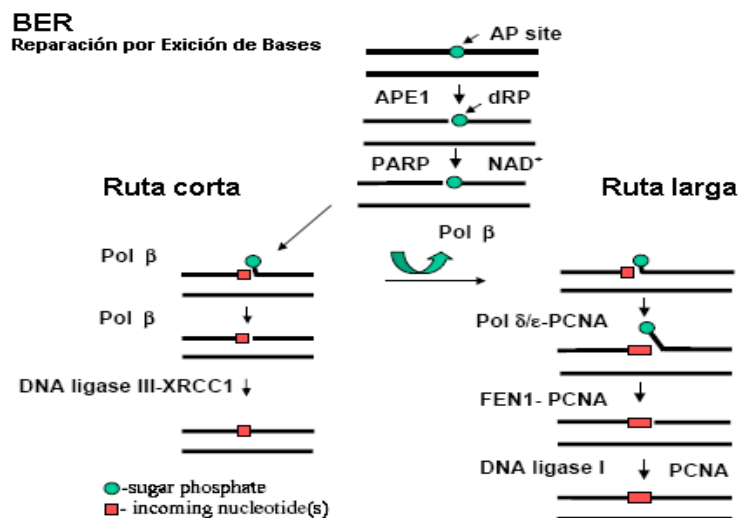
5.3 REPARACIÓN DE LESIONES EN EL ADN

La célula tiene una gran variedad de sistemas de reparación para los diferentes tipos de daños o lesiones en el ADN, como producto de diferentes procesos biológicos [39], dentro de estos sistemas se encuentran los genes de reparación, asociados a la señalización y regulación de la reparación del ADN en diferentes mecanismos como: reparación de bases mal apareadas por errores de replicación (Mismatch Repair (MMR)), reparación por escisión de bases oxidadas o sitios AP (Base Excision Repair (BER)), reparación por escisión de nucleótidos que contienen dímeros de pirimidinas o purinas (Nucleotide Excision Repair (NER)), reparación por recombinación del daño directo en el ADN y rompimientos de cadena doble, por dos mecanismos: reparación por recombinación de homólogos (Homologous Recombination (HR)) ó unión de terminales no homólogos (Non Homologous End Joining (NHEJ)). El mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) actúa principalmente sobre el daño asociado al estrés oxidativo, sus glicosilasas juegan un papel importante en el reconocimiento del daño relacionado con las lesiones en las bases.

5.3.1 Mecanismo de Reparación por Escisión de Bases. Varios mecanismos han sido identificados para la reparación del genoma, después de un estrés oxidativo; el sistema de reparación BER es el principal sistema de reparación en eucariontes [40], este sistema está altamente conservado desde bacterias hasta

humanos, es un mecanismo de defensa del ADN contra diferentes factores, tales como: respuesta inflamatoria, agentes químicos y agentes alquilantes. El sistema presenta dos rutas a saber: una ruta corta y una ruta larga, en la ruta corta; se da la identificación del daño e incisión por acción de la ADN Glicosilasa, produciéndose la hidrólisis del enlace N-glicosídico y formación del sitio apurínico (abásico); la glicosilasa también cumple la función de AP liasa; posteriormente, actúa una AP endonucleasa que elimina el sitio apurínico; y luego interviene la ADN pol β que inserta el nuevo nucleótido; finalmente por acción de la ligasa III y modulada por la proteína de anclaje XRCC1, se completa el proceso de sellamiento y reparación. La parte inicial de la ruta larga, es exactamente igual al inicio de la ruta corta donde se da la identificación del daño, por la acción de la ADN glicosilasa; la actividad de una u otra ruta depende de la forma resultante del sitio apurínico, luego de la acción de la glicosilasa; si el residuo es en forma hemiacetal, se desencadena toda la maquinaria de la ruta corta, y si la forma de este residuo es aldehído, se desencadenará la ruta larga; ésta ruta es dependiente del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular ((PCNA) Proliferating Cell Nuclear Antigen) donde interviene el complejo RF-C/Fen1 Factor de Replicación C (Replication Factor C (RF-C))/(endonucleasa Fen1), el complejo PCNA/ Fen1 desplaza y corta la cadena, la futura síntesis, se completa por la acción de la Pol σ ó ϵ formando complemento con PCNA y finalmente la acción de la Ligasa I, es estimulada por PCNA finalizando la reparación [41], (Ver figura 1). Cuando el mecanismo BER fracasa se da paso a otras vías de reparación por mecanismos biológicos que intentan reparar el daño.

Figura 1. Sistema de Reparación Por Excisión de Bases (BER), y sus dos rutas alternas.

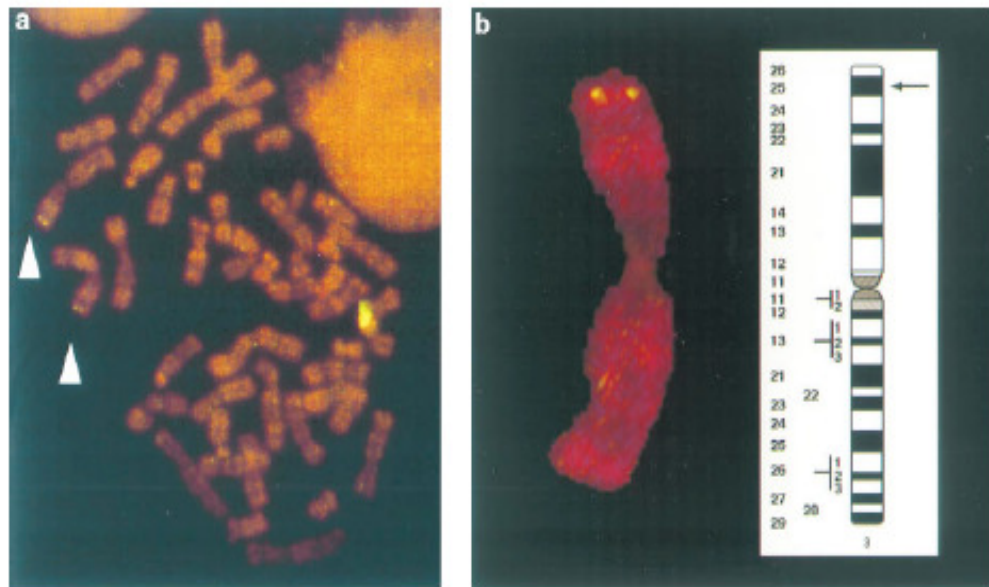


Fuente: Modificado de Dianov Grigory L. et al. Repair of abasic sites in ADN Mutation Research., U. K, Vol. 531, 2003; p.157–163.

5.4 GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h)

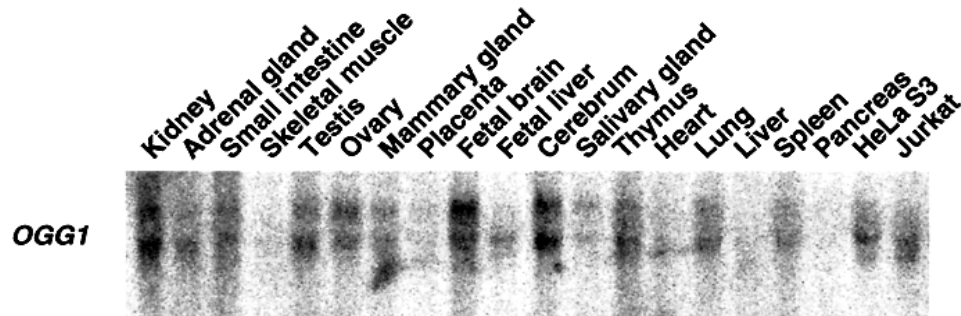
El gen OGG1 se localiza en el cromosoma 3 en la región 25 del brazo corto (3p25) (Ver figura 2), esta región codifica para dos formas de OGG1h; se ha observado que además pierde frecuentemente su heterocigocidad en células de tumores de pulmón y riñón [18]. Se ha visto que este gen se expresa en la mayoría de tejidos del organismo, incluso en los estadios fetales de mamíferos (Ver figura 3) [42].

Figura 2. Localización cromosómica del gen OGG1h determinado por FISH (a) Señales de hibridación en el cromosoma 3 (b) Ideograma del cromosoma 3 donde se observa la localización del gen OGG1h en 3p25



Fuente: tomado de RADICELLA *et al.* Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci, 1997, 94: 8010–8015.

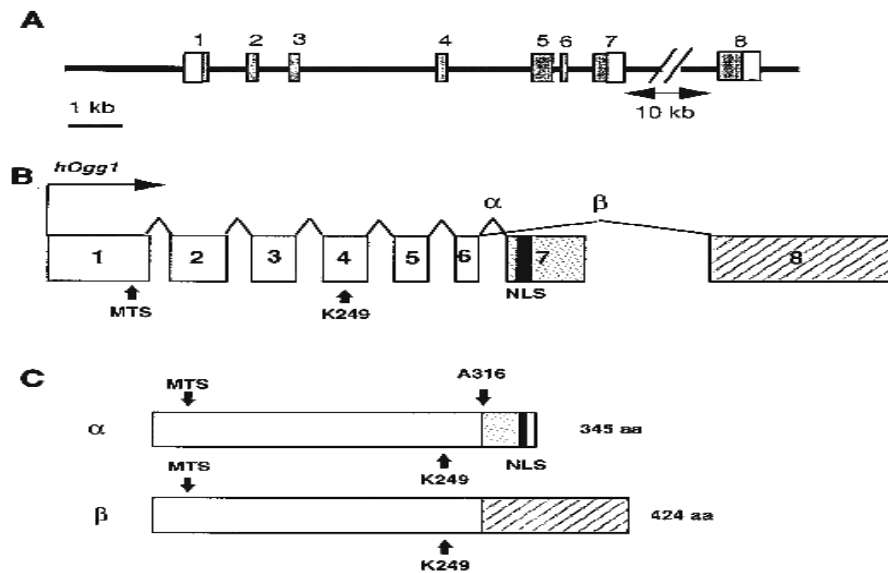
Figura 3. Expresión del gen OGG1 en diferentes tejidos humanos



Fuente: Tomado de NISHIOKA K, et al. Expression and Differential Intracellular Localization of Two Major Forms of Human 8-Oxoguanine ADN Glycosylase Encoded by Alternatively Spliced OGG1 mRNAs. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 10, 1999, p 1637–1652

5.4.1 Organización y Estructura del Gen OGG1h. Diferentes estudios han permitido identificar dos trazas de ARN mensajero, con un marco de lectura que codifica para péptidos de 345 y 424 aminoácidos, la isoforma α OGG1h es una proteína de localización nuclear y la isoforma β OGG1h de localización mitocondrial (Ver figura 4). La isoforma α OGG1h es la más estudiada por su gran funcionalidad y su importancia en la reparación del genoma nuclear, estudios realizados identificaron que la proteína que mas se expresaba en la mayoría de tejidos del organismo era la isoforma α , su funcionalidad en los procesos de reparación, esta asociada al estado del gen o a sus variantes polimórficas; se ha logrado observar que el polimorfismo del gen OGG1h esta ubicado en el codón 326 exón 7, este último con un tamaño de 45 pb. En humanos, el gen 8-oxoguanina ADN glicosilasa 1 (OGG1) con un tamaño total de 1583 pb codifica para una ADN glicosilasa, con actividad catalítica y AP liasa de peso molecular de 38.7 KDa, que se encarga de la remoción del daño 8-hidroxiguanina (8-OH-G) u 8-oxoguanina (8-O-G); esta reparación se da mediante el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) [37, 43], este mecanismo cuenta con la acción de la ADN glicosilasa OGG1 que remueve la base modificada o dañada, mediante la hidrólisis del enlace N-glicosídico seguida de la acción AP liasa; posteriormente la AP endonucleasa elimina el sitio apurínico permitiendo que la ADN polimerasa rellene el sitio apurínico con la nueva base, inmediatamente la ADN ligasa III sella el enlace glicosídico, produciéndose la reparación completa; en esta ruta, es muy importante la proteína XRCC1 como una proteína de anclaje [44].

Figura 4. Organización genómica del gen OGG1h **(A)** Estructura genómica de la región que transcribe para la proteína Ogg1. Los rectángulos blancos son los exónes; 1, 7 y 8 representan las regiones 59 y 39 de ARNm. **(B)** Variantes transcrito primario del gen *OGG1h*. La flecha indica la dirección de transcripción del gen *OGG1*. MTS, *putative mitochondrial targeting signal*; NLS, *nuclear localization sequence*. **(C)** Isoformas α - y β -OGG1h las cuales están compuestas de 345 y 424 aminoácidos, respectivamente. La lisina catalítica 249 es un indicador. La alanina 316 marca la terminación de la secuencia común entre las formas α - y β - del gen OGG1h.



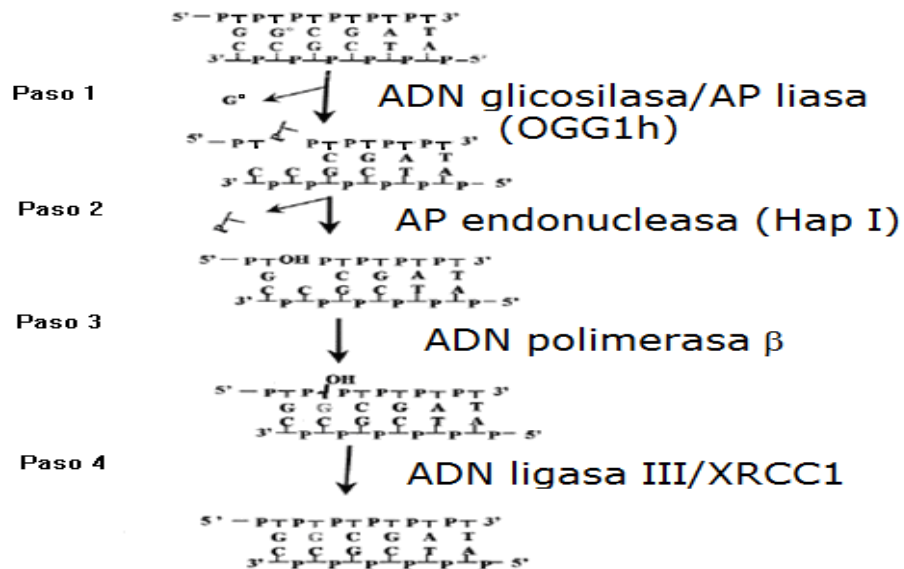
Fuente: tomado de Boiteux, S and, Radicella, J.P., The Human *OGG1* Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, Vol. 377, No. 1, pp. 1–8

Un estudio realizado en el año 2000 logró determinar que la secuencia correspondiente al promotor, revela la ausencia de las cajas TATA o CATT, sugiriendo que éste corresponde, al promotor de un gen **housekeeping**; además se consiguió establecer que la expresión del gen OGG1 no es modulada durante el ciclo celular, ésta es una característica de muchos genes llamados domésticos [45]. Existen diferentes ADN glicosilasas homólogas al gen OGG1; en *Escherichia coli* existen 2 ADN glicosilasas que previenen procesos de mutagénesis producidas por la 8-hidroxiguanina, la primera proteína *Fpg* que corta el daño de la 8-hidroxiguanina (8-OH-G) en el ADN y la segunda proteína *MutY* (*micA*) que corta los residuos de adenina incorporados por las polimerasas frente al daño de la 8-OH-G. En *E. coli* la inactivación de ambos genes *Fpg* y *MutY* resulta en el incremento de transversiones de GC a TA originándose un fenotipo mutador. En *Saccharomyces cerevisiae* el gen OGG1 codifica una ADN glicosilasa que

remueve el daño en el ADN inducido por 8-OH-G estirpes deficientes de OGG1 exhiben un fenotipo mutador que acumula transversiones GC a TA [37]. La eficiencia en la reparación de daños agrupados en el ADN depende de la separación de la interlesión, pero el mecanismo de reacoplamiento de una ruptura de cadena sencilla en presencia de 8 oxo-guanina obedece a la orientación relativa de estos dos tipos de lesión. La inhibición de la eficiencia de excisión de las lesiones del ADN dentro de un daño agrupado por las glicosilasas y AP endonucleasas, depende de la ubicación del sitio de excisión de la 8 oxo-guanina por la OGG1 que es reducida cuando la 8 oxo-guanina está presente a pocas bases del extremo 3' ó 5' del sitioapurínico o la ruptura de cadena sencilla en la cadena opuesta [46].

5.4.2 Actividad Glicosilasa/AP Liasa del Gen OGG1. La enzima OGG1 presenta la propiedad de ser una enzima bifuncional, luego de la remoción de la base oxidada por acción de la ADN glicosilasa; puede actuar también como AP liasa rompiendo el enlace fosfodiéster del extremo 3' del sitio abásico (Ver figura 5). La acción de la ADN glicosilasa que ha generado un sitio abásico, y la posterior actividad de esta misma actuando como AP liasa genera en el ADN un sitios AP que es potencialmente citotóxico, porque bloquean la replicación y la transcripción de ADN [47].

Figura 5. Doble función de la ADN Glicosilasa OGG1h actuando también como AP liasa.

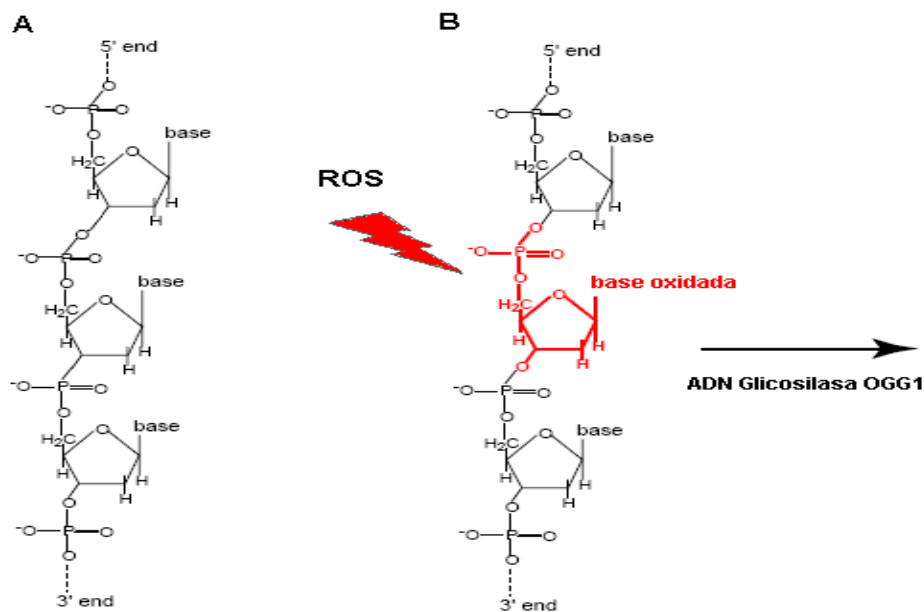


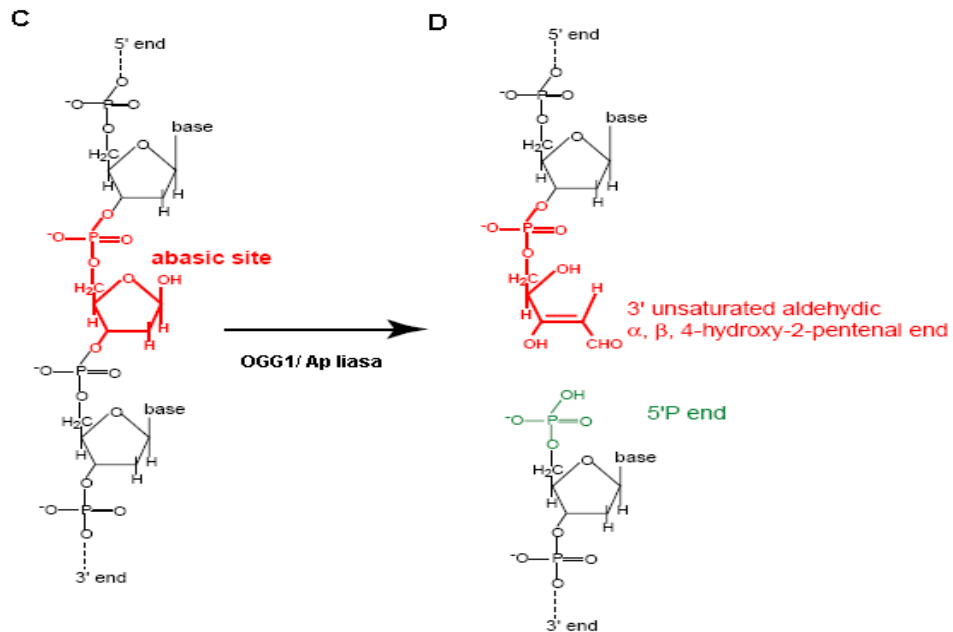
Fuente: tomado de Boiteux, S and, Radicella, J.P., The Human *OGG1* Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, Vol. 377, No. 1, pp. 1–8

El rompimiento de los sitios AP por acción de las ADN glicosilasas/AP liasas resulta en la formación de rupturas de cadena sencilla con extremos 3' y 5' bloqueados que no pueden ser usados como sustrato por las ADN polimerasas o ADN ligasas [48] (Ver figura 6). Estos extremos son liberados por la actividad en conjunto de la ADN polimerasa β con acción fosfodiesterasa/polimerasa [49] que al unirse a la OGG1 (función AP liasa) elimina el enlace 3' fosfodiéster, generando un extremo 3' OH que será usado como sustrato por la ADN polimerasa β/δ agregando los nucleótidos faltantes y posteriormente el sellamiento de la cadena de ADN, por el complejo XRCC1/Lig III [48, 50].

Se ha observado que el complejo formado entre la enzima (glicosilasa/AP liasa) y el producto final de la eliminación del sitioapurínico 3' es extremadamente estable con promedio de vida mayor a 2 horas [51]. Los sitios AP pueden formarse por hidrólisis espontánea de los enlaces N-glicosídicos. Se ha establecido que más de 1000 bases se pierden por día en células de mamíferos [52]. La mayoría de bases inapropiadas y daños en el ADN son removidos por glicosilasas específicas, generando sitios AP.

Figura 6. Actividad de la ADN Glicosilasa OGG1h y su actividad AP liasa en relación con las rupturas de cadena sencilla. **(A)** Cadena sencilla de ADN en estado normal. **(B)** Cadena de ADN atacada por las especies reactivas de oxígeno y estimulación de la acción de la ADN glicosilasa. **(C)** Formación del sitio AP por operación de la ADN Glicosilasa. **(D)** Extremos del ADN bloqueados por acción de la glicosilasa / AP liasa OGG1h (ruptura de cadena sencilla).





Fuente: Modificado de Boiteux, S., and Guillet, M., Abasic sites in ADN: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, ADN repair 2004, 3: 1-12

5.5 POLIMORFISMO GENÉTICO.

Se denomina polimorfismo a los diferentes alelos de un gen, o específicamente a la variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población. Son, por lo tanto, diferentes de las mutaciones, que son mucho menos frecuentes y van asociadas, habitualmente, a enfermedades hereditarias. Se pueden distinguir dos tipos de polimorfismo genético: los polimorfismos de repetición en tándem (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*) y los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*). Por otra parte los polimorfismos han jugado un papel relevante en la identificación del origen del hombre y en la selección natural. El tipo más frecuente de polimorfismo genético es el de un sólo nucleótido o SNP, estos son diferencias de una sola base que aparecen en la secuencia del ADN entre individuos de una población. Se estima que 1 de cada 200-300 bases del ADN humano podría ser un SNP. Los SNP pueden ocurrir tanto en regiones codificadoras (exones) como en no-codificadoras (intrones y promotores) del genoma. Ya que sólo el 3%- 5% del ADN humano codifica para la producción de proteínas, la mayoría de los SNP se encuentran fuera de las regiones codificadoras. Cuando el SNP ocurre dentro de la región codificadora del gen, o exón, la probabilidad de que se altere la función biológica

de la proteína es mayor, ya que el cambio de base puede traducirse en la sustitución de un aminoácido por otro. El análisis de los SNPs ha permitido identificar la asociación de ciertos genes con la enfermedad [53, 54].

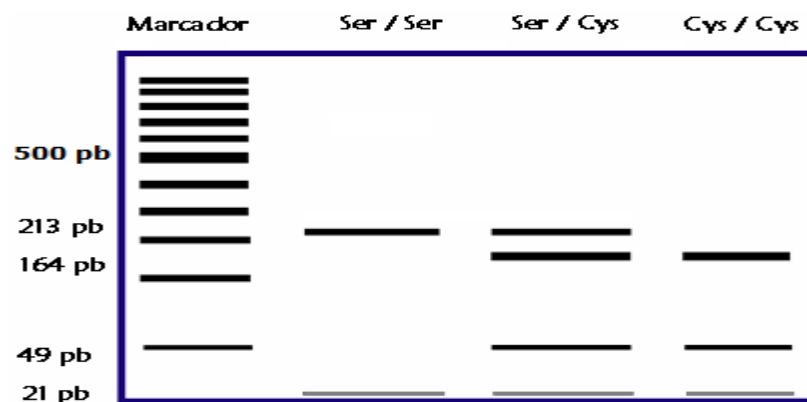
5.6 POLIMORFISMO DEL GEN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h)

Varios polimorfismos del gen OGG1 se han identificado y su actividad se ha visto relacionada con las variantes genotípicas para los mecanismos de reparación; diferentes estudios han evaluado el polimorfismo serina–cisteína (*Ser-Cys*), ubicado en el exón 7, codón 326; con importantes funciones biológicas [21]. El polimorfismo es identificado por la presencia de una base diferente en la secuencia del ADN, el cambio en la secuencia silvestre TCC que codifica para el aminoácido serina (Ser) por el cambio TGC que codifica para el aminoácido cisteína (Cys); a este cambio se le denomina SNP donde ocurre el cambio de la base citosina (C) por la base guanina (G) (Ver tabla 3); el genotipo silvestre observado en gel de agarosa *Ser/Ser* presenta un producto de 213pb, el heterocigoto polimórfico *Ser/Cys* con producto de 213pb, 164pb y 49pb y finalmente el homocigoto polimórfico *Cys/Cys* con productos de 164pb y 49pb; en todos los genotipos se observa un fragmento invariante de 21pb [55] (Ver figura 7).

Tabla 3. SNP del gen OGG1h codón 326 exón 7

Polimorfismo del Gen OGG1h	TCC	TCC	Ser-Ser	Homocigoto silvestre	Codón 326 Exón 7
	TCC	TGC	Ser-Cis	Heterocigoto polimórfico	
	TGC	TGC	Cis-Cis	Homocigoto Polimórfico	

Figura 7. Patrón de bandas de las variantes alélicas del gen OGG1h.



5.6.1 Polimorfismo del Gen OGG1h, Susceptibilidad Genética y Riesgo de Cáncer. El cáncer es una enfermedad frecuente, se estima que una de cada tres personas de la población general desarrollará un cáncer a lo largo de su vida. El cáncer aparece con mayor frecuencia a edades avanzadas, como consecuencia de alteraciones genéticas producidas a lo largo de la vida del individuo o de factores genéticos de susceptibilidad (polimorfismos genéticos) que recibe el individuo en el momento de la concepción. Las alteraciones genéticas responsables del cáncer son el resultado de factores ambientales, estilo de vida, hormonales e inmunológicos, estos factores pueden ser de carácter heredado cuando son transmitidos de una generación a otra y/o de carácter adquirido cuando se expresan durante el período de vida del individuo, afectando mecanismos y generando deficiencia del sistema inmune en respuesta a un factor ambiental que los conllevó a dicha adquisición. La reciente identificación de varios genes de predisposición a ciertos tipos de cáncer, permite entender qué no es el cáncer lo que se hereda, sino la predisposición o susceptibilidad genética a desarrollarlo. Y que el hecho de heredar una susceptibilidad genética a desarrollar cáncer no es sinónimo de que se acabe desarrollando un tumor, sino que el riesgo de desarrollarla es significativamente superior al de la población general para dicho tipo de cáncer [56]. Se dice entonces que la susceptibilidad está determinada por las variantes genéticas o polimorfismos genéticos que modulan la expresión alterada de los genes involucrados en procesos carcinogénicos que difieren de un individuo a otro, entre ellos están los genes relacionados con el metabolismo de químicos (biotransformación), con la eficiencia de reparación del daño ocasionado al ADN, con la función de protooncogenes y los genes supresores de tumor [39].

La proteína o enzima de reparación 8-oxo-guanina es muy importante en el entendimiento del impacto biológico de las ROS, en las diferentes enfermedades degenerativas humanas. El daño del gen OGG1h se sabe, puede causar susceptibilidad espontánea para el desarrollo del cáncer inducido por estrés oxidativo [18]. La inactivación del gen de reparación OGG1h, genera un fenotipo mutador espontáneo, caracterizado por el marcado incremento de las transversiones GC a TA [20]. Se ha demostrado que las variantes polimórficas del gen de reparación OGG1h confieren susceptibilidad individual actuando como modificador de riesgo a desarrollar diferentes patologías [57]. Diversos estudios mencionan que el polimorfismo del gen OGG1 Ser326/Cys326 es de mayor prevalencia en poblaciones asiáticas (0.40-0.61), respecto a poblaciones caucásicas (0.13-0.27) [58], otros estudios permitieron establecer que el 40% de los pacientes con cáncer de pulmón presentaban bajos niveles de actividad del gen OGG1, aunque fue clara la relación entre el polimorfismo del OGG1h y la actividad de reparación [59]; otro estudio con un tamaño de muestra pequeño (n=35) no logra establecer la asociación entre el polimorfismo del gen OGG1 Ser326/Cys326 y la actividad de reparación del gen OGG1 en linfocitos humanos [60], sin embargo, se han publicado datos consistentes con la asociación entre la variante del OGG1 Ser326/Cys326 y el incremento del riesgo a desarrollar varios

tipos de cáncer como pulmón, cuello y en tejidos blandos de cabeza [61]. Un estudio en una población China, demostró que el polimorfismo del gen OGG1 Ser326/Cys326 está asociado con riesgo a desarrollar pterigio [25], otros además, han encontrado una interacción gen/ambiente, mostrando una relación significativa entre el genotipo del gen OGG1 Ser326/Cys326 y la gastritis atrófica, sugiriendo que estos factores relacionados muestran una alta susceptibilidad a cáncer gástrico [21].

5.7 MONITOREO BIOLÓGICO

Monitorización es el procedimiento de medición e interpretación de parámetros biológicos y ambientales, mientras que monitoreo biológico es el procedimiento de salud ocupacional por el cual se mide un tóxico potencial, sus metabolitos o un efecto químico no deseado en una muestra biológica, con el propósito de evaluar la exposición a ese agente. La exposición puede ser valorada midiendo la concentración del tóxico en muestras de aire (monitorización ambiental) o identificando parámetros biológicos en el trabajador: sangre, orina o aire exhalado (monitorización biológica). A estos últimos se les llama indicadores biológicos de exposición o biomarcadores. El monitoreo biológico mide la cantidad de agente absorbido, independiente de la vía de ingreso, y es una actividad regular y repetitiva con fines preventivos, por lo que no debe ser confundida en clínica con los llamados procedimientos diagnósticos. El monitoreo biológico presupone establecer cuatro condiciones: 1. la sustancia química o sus metabolitos deben estar presentes en algún tejido, excreción o fluido corporal y además debe tener un nivel apropiado para su medición; 2. los métodos de análisis de la muestra deben ser válidos, prácticos y además deben estar disponibles en el medio; 3. la estrategia de medición debe ser adecuada, es decir la muestra debe ser representativa y tomada en el tiempo indicado; 4. los resultados permitan ser interpretados matemáticamente y además deben ser estadísticamente significativos [62].

5.8 BIOMARCADORES

En general se podría definir, como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra. Silbergeld y Davis [63] hablan de marcadores biológicos para referirse a señales fisiológicas inducidas por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia del organismo frente a esta agresión. Sin duda, la

ventaja principal del empleo de biomarcadores radica en que considera las variaciones interindividuales (diferencias en la absorción, biodisponibilidad, excreción o en los mecanismos reparadores del ADN) e incluso, intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Ello conlleva a una evaluación de la exposición individualizada [64]. De esta manera, un biomarcador evalúa el riesgo de salud, verificando la relación causa-efecto, dosis-efecto, midiendo la efectividad de un tratamiento o de ayuda con el pronóstico; y particularmente en salud ocupacional, permite controlar riesgos, midiendo la exposición [9].

Estos biomarcadores deben cumplir con criterios de validación para poder ser usados dentro de investigaciones dirigidas a evaluar riesgo de enfermedad, según Bonassi [27], para que un biomarcador sea validado, debe permitir evaluar el riesgo e impacto en la salud; el concepto general de validez se refiere al rango de características del biomarcador las cuales son determinantes en el procedimiento analítico, debe además reflejar los acontecimientos relevantes en la patogénesis de enfermedades humanas, importantes dentro de la investigación ambiental, para ello el biomarcador debe cumplir tres pasos: el primero, es el desarrollo del biomarcador, evaluar su sensibilidad, confiabilidad y exactitud para el análisis, optimización del protocolo del ensayo y obtención de la muestra; el segundo paso: es caracterización del biomarcador, evaluar la variabilidad del biomarcador en poblaciones humanas, determinando las interacciones relevantes y posibles distractores y por último en tercer lugar: se debe evaluar la asociación causal entre el biomarcador y la enfermedad, a través de estudios epidemiológicos longitudinales.

Varios tipos de biomarcadores han sido desarrollados para el monitoreo de múltiples eventos en etapas de procesos precisos, estos biomarcadores, han sido usados para elucidar las funciones de reparación del ADN, basadas en la medida de actividades biológicas como consecuencia de la deficiencia de la reparación del ADN [65], los biomarcadores pueden dividirse en categorías específicas: dosis interna, dosis efectiva biológica, biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad [66, 67]. Los biomarcadores de mutación y efectos citogénéticos, son marcadores de respuestas tempranas de las células al daño carcinógeno inducido, estos efectos pueden ser medidos en tejido blanco como sangre periférica. Los biomarcadores incluyen medida de rompimiento de la cadena sencilla de ADN; varios efectos citogénéticos, incluyendo: alteraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), micronúcleos (MN) y mutaciones somáticas. Dado que estos marcadores no son químicos o exposiciones específicas, la información sobre otros factores ambientales y estilos de vida (ej. consumo de cigarrillo, alcohol, exposición a la radiación, drogas e infecciones virales) pueden afectar los resultados de las pruebas [68].

La medida de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica, ha sido usada extensivamente como un monitor sensible a la exposición de la

radiación ionizante, también puede ser monitoreada después de la exposición a ciertos químicos [69, 70]. El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es considerado un marcador citogenético sensible, la lesión permite la formación de estos cambios que pueden persistir en las células por días, meses y algunos años. El incremento de los niveles de ICH en células de sangre periféricas es el resultado de la exposición a humo de cigarrillo, ciertos factores en lugares de trabajo y el consumo de drogas [69]. La prueba de micronúcleos (MN) provee una medida confiable de daño o pérdida cromosómica, ampliamente usado para evaluar riesgo de cáncer [27].

El uso de biomarcadores en estudios de cáncer humano se ha incrementado en las últimas dos décadas. Aunque, muchos estudios son de naturaleza “transicional” [66], de pequeña escala y diseño limitado, se ha demostrado su enorme potencial con estudios en humanos [71]. Los marcadores biológicos de exposición se han integrado a asuntos epidemiológicos e indican la exposición por múltiples vías, múltiples superficies y diferentes patrones (pasado, presente, intermedio y continuo). Este uso puede incrementar las posibilidades para prevención del cáncer, identificar los niveles aceptables de exposición y de otra manera entender el desarrollo del cáncer [72].

5.8.1 Biomarcadores de exposición. Definidos como indicadores biológicos que permiten medir dosis interna analizando metabolitos de un compuesto exógeno dentro del organismo al estar expuesto a un xenobiótico y la dosis biológicamente efectiva obtenida mediante el análisis de aductos en ADN y proteínas, éstos biomarcadores son ampliamente usados para el monitoreo biológico tanto en estudios con plantas como en animales sensibles a la contaminación ambiental, e identificar si la exposición a este xenobiótico esta alterando procesos biológicos que pueden desencadenar una enfermedad [73].

5.8.2 Biomarcadores de efecto. Indicador de respuesta biológica observable a través los cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos, además permite monitorear el daño cromosómico celular en individuos de poblaciones expuestas a agentes químicos y/o físicos que alteran la función, estructura y composición celular, estos daños ocasionan inestabilidad genómica, observable por medio las biomarcadores validados que muestran dicha inestabilidad y predicen el riesgo de enfermedad como alteraciones cromosómicas (AC’s), y micronúcleos MN [73].

5.8.3 Biomarcador de susceptibilidad. Estos biomarcadores son centinelas de la respuesta individual a la exposición a carcinógenos ambientales/ocupacionales y reflejan la susceptibilidad de carácter adquirido o heredado de un organismo

para responder a la exposición de agentes químicos. Estos biomarcadores permiten identificar polimorfismos de los genes involucrados en procesos carcinogénicos como el metabolismo, defectos de reparación, etc., e identificar individuos y poblaciones ocupacionalmente expuestas en mayor predisposición a desarrollar cáncer. Factores como la edad, estilo de vida, el consumo de cigarrillo y alcohol, pueden jugar un papel en la modulación de los efectos genotóxicos por la exposición a agentes genotóxicos como los químicos [39].

5.9 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's).

El fragmento de ADN amplificado correspondiente al gen OGG1h puede ser observado a través de la prueba molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Reaction Polymerase Chain), ésta técnica fue descubierta en 1985 por Kary Mullis [74]. En la actualidad la PCR es una técnica comúnmente usada en los laboratorios de investigación por biólogos y médicos en una variedad de trabajos, que van desde ordenar genes, identificar polimorfismos, diagnosticar enfermedades hereditarias e infecciosas, identificar las huellas digitales genéticas (usadas en el área forense y en pruebas de paternidad) y hasta la creación de organismos transgénicos [75].

Luego de la obtención del ADN amplificado por la técnica de PCR, se lleva a cabo otra técnica molecular denominada RFLPs (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) sigla de su nombre en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism; esta técnica permite detectar fragmentos de ADN de distinta longitud (peso molecular), después de la digestión con una enzima de restricción, identificando una secuencia palindrómica (secuencias que se leen igual en ambas direcciones) en la cual un SNP o polimorfismo de un solo nucleótido (consistente en el cambio de una base en un codón específico) que ha generado un sitio de restricción. El SNP del gen OGG1h consiste específicamente en el cambio de una citosina en la secuencia silvestre TCC que codifica para el aminoácido serina (Ser) por el cambio a una guanina TGC que codifica para el aminoácido cisteína (Cys). Este SNP es identificado por la enzima de restricción tipo II Sat I (Fnu4HI), la cual corta de manera consistente y predecible dentro de la secuencia que reconoce [76].

5.10 PRUEBA CITOGENÉTICA DE MICRONÚCLEOS (MN).

5.10.1 Definición. Prueba que permite identificar un fragmento de ADN producto de una ruptura cromatídica, cromosómica o cromosoma rezagado, que después de la duplicación del ADN y de la cariocinesis es rodeado de membrana nuclear; el material genético desprendido se observa en interfase como un pequeño núcleo o “micronúcleo” que además presenta la misma intensidad del núcleo principal [77].

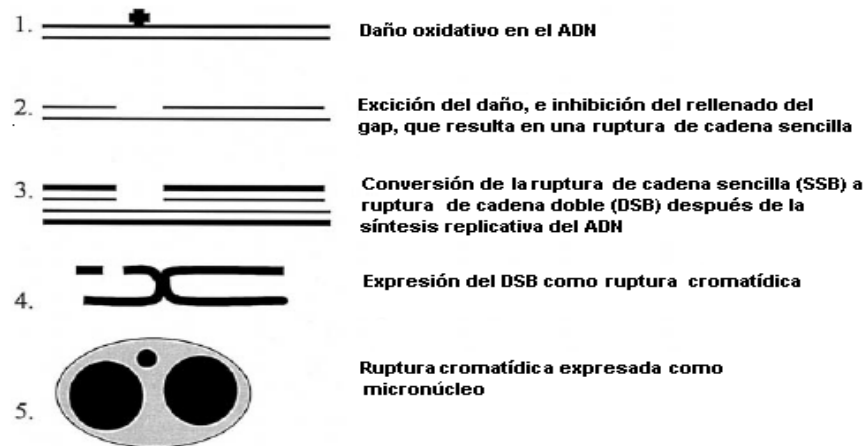
5.10.2 Principio de la prueba. Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo, se replica y divide equitativamente, dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, estos errores pueden reflejar exposición a agentes clastogénicos (rupturas cromosómicas) y/o agentes aneugénicos (efecto sobre el número de cromosomas con pérdida o adición del material genético), cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado “micronúcleo” (MN) [28, 78]. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante anafase mitótica. Los fragmentos cromosómicos pueden ser el resultado del rompimiento directo de la doble cadena del ADN, la conversión de la ruptura de cadena sencilla a ruptura de cadena doble, luego de la replicación celular, o inhibición de la síntesis de ADN observándose el micronúcleo (Ver figura 8) [55].

En estudios poblacionales, la frecuencia de MN es comúnmente establecida en cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados a dividirse con fitohemaglutinina; el método frecuentemente aplicado para la observación de los MN es el bloqueo de la citocinesis, en el cual la evaluación de las células se limita a aquellas que se han dividido una sola vez por la estimulación del mitógeno. Los MN observados en linfocitos cultivados surgen primariamente *in vitro* de: a) tipo-cromatídico, alteraciones cromosómicas formadas durante la replicación del ADN; b) tipo-cromosómico, alteraciones existentes antes de la mitosis y replicación del ADN; ó c) daños en el huso mitótico[77].

5.10.3 Significancia Biológica. El proceso responsable de la formación de los MN puede ser un mecanismo importante por el cual las células pierden su heterocigocidad reflejando inestabilidad genómica [68], los micronúcleos son biomarcadores citogenéticos de efecto validados, usados para el monitoreo

biológico del daño cromosómico en poblaciones expuestas a agentes químicos y físicos [79], la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica son un predictor de riesgo de cáncer, según evidencia epidemiológica, experimental y de asociación, que relacionan la medida del daño genómico en linfocitos y la ocurrencia de eventos tempranos de carcinogénesis en tejidos blanco por factores ambientales y dietarios [7].

Figura 8. Formación de micronúcleos y replicación del ADN.

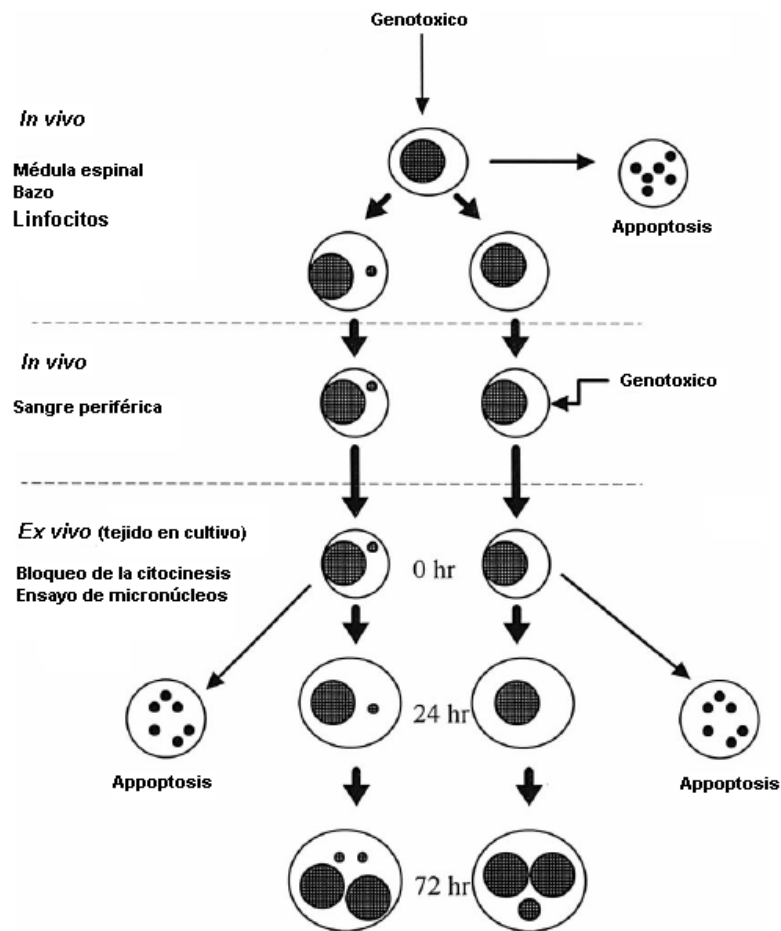


Fuente: Modificado de Fenech, M., The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 2000, 455: 81–95

5.10.4 Prueba de MN con bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos pueden acumular lesiones en su ADN en la fase G_0 que no serían expresadas hasta que dichos linfocitos se estimulen en cultivo *in vitro*. Es posible distinguir entre estos dos eventos realizando el recuento de MN en linfocitos mononucleados, a las 24 horas de cultivo post-estimulación y en células binucleadas que pueden contener MN preexistentes, más las lesiones que son expresadas como MN durante el cultivo *in vitro*, a las 72 horas post estimulación [80] (Ver figura 9). El conteo de MN en células binucleadas, por bloqueo de la citocinesis con citocalacina B (CBMN), se ha establecido en un procedimiento estándar en la toxicología genética, aunque el éxito del ensayo CBMN ha sido debido inicialmente a la solución que la técnica proporciona al problema cinético, lo que permite observar daños acumulados durante un tiempo determinado en los linfocitos luego de la estimulación de una nueva interfase mitótica, siendo evidente que fueron estas características las que mejoraron su aplicabilidad [81]. La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la

sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina de la rata, entre otros.

Figura 9. Expresión de los micronúcleos (MN) de linfocitos en división en cultivos *in vivo* y *ex vivo*.



Fuente: tomado de Fenech *et al.* The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring ADN damage in humans. *Mutat Res*, 1999; 428: 271-283.

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez por Countryman y Heddle [82], cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley [83], consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica. Para ello

desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (*CBMN: cytokinesis-block micronucleus*) cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B (Cit-B) que impide la citocinesis celular [84], la cit-B, es un compuesto aislado del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis, al imposibilitar la creación del anillo contráctil constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Este compuesto químico no afecta a las fibras del huso, ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas y que han sufrido una sola división [85]. El ensayo de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis ha sido ampliamente usado para la evaluación de daño cromosómico inducido por radiaciones ionizantes y clastógenos químicos [86]

5.10.5 Ventajas de la prueba. La prueba es relevante para cuantificar daño cromosómico; evaluar presencia y alcance del daño cromosómico en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos; mide efecto clastogénico y aneugénico [7] ; es tan sensible como alteraciones cromosómicas (AC) y su registro es mas sencillo ya que evita la complejidad del análisis de daños en metafases [87]; y finalmente brinda gran poder estadístico [88]; otras ventajas de la prueba de micronúcleos consiste en la facilidad y la rapidez, la posibilidad de probar el efecto de un químico, la abundancia de células analizables en diferentes períodos del ciclo celular y el que los micronúcleos formados durante la división celular persisten, al menos, durante la siguiente interfase; además, la prueba no deja lugar a dudas sobre el daño producido, pues lo que se observa como micronúcleos es claramente una pérdida de ADN [89].

5.10.6 Validación de la prueba de MN. El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN, Fenech y colaboradores [28], se creó el Proyecto Humano Internacional de Micronúcleos (*HUMN: HUmAn MicroNucleus Project*) que describe el uso de la técnica de MN para medir el daño en el ADN en humanos, donde participaron laboratorios de Europa, Asia y Norte América, con un total de 16.500 individuos que fueron analizados durante el período de 1985 y 1996, el principal objetivo consistió en identificar las fuentes y niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos, comparar las distintas técnicas utilizadas para definir un protocolo estándar y criterios para registro y conteo (Ver tabla 4), necesarios para realizar así un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados, e incluso, establecer una asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades como el cáncer [28]. En el año 2000, Albertini y colaboradores [77], mencionan que la investigación epidemiológica prospectiva no indicó valores predictivos de cáncer para los altos niveles de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos, esto probablemente por la variación metodológica de los estudios y el número limitado de observaciones, donde se pudo concluir

que no es posible asociar la frecuencia de micronúcleos con el riesgo de cáncer. Según Bonassi y colaboradores en el 2007 [7], la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica era ampliamente usada como biomarcador de daño cromosómico e inestabilidad genómica en poblaciones humanas. Se tenían evidencias teóricas sobre el rol causal de la inducción de MN en el desarrollo del cáncer; sin embargo, era necesario realizar estudios prospectivos de cohorte para validar los MN como un biomarcador de riesgo de cáncer. Para ello se contó con un total de 6.718 individuos de 10 países, evaluados en 20 laboratorios durante un periodo de tiempo de los años 1980 y 2002 y de esta manera obtener la frecuencia de MN, para estudios rutinarios de vigilancia citogenética, que se seleccionaron de la base de datos del proyecto HUMN seguido por la incidencia de cáncer o mortalidad. Este estudio proporcionó evidencia sobre el incremento en la frecuencia de MN como un biomarcador que puede predecir riesgo de cáncer en poblaciones de individuos saludables; además, el amplio uso de la prueba de MN provee una valiosa oportunidad para aplicar este análisis en el planeamiento y validación de los programas de vigilancia y de prevención del cáncer.

Tabla 4. Criterios definidos por el *HUMAN MicroNucleus Project* (HUMN) para la selección de células binucleadas y de micronúcleos en cultivos de células humanas

Criterios para células binucleadas	Criterios para micronúcleos
El citoplasma debe distinguirse claramente	El diámetro oscila entre 1/16-1/3 de la medida del diámetro del núcleo principal
Membrana nuclear y citoplasmática intactas	No refractarios
Núcleos con similar grado de condensación de la cromatina	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior
Igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción	Forma similar a los núcleos de la célula binucleada
Pueden estar unidos por puentes núcleo-citoplasmáticos	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada
Pueden tocarse pero no solaparse	Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse con ellos
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis	

Fuente: Tomado de Fenech *et al.* The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring ADN damage in humans. *Mutat Res*, 1999; 428: 271-283.

5.11 MICRONÚCLEOS Y RIESGO DE CÁNCER

La medición de la frecuencia de micronúcleos MN en linfocitos de sangre periférica, es usado ampliamente en epidemiología molecular y en citogenética para evaluar la presencia y la magnitud del daño cromosómico en poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos o susceptibles genéticamente [28], estos biomarcadores han sido usados para identificar el impacto de los factores genéticos y dietarios sobre la estabilidad genómica. Los eventos que pueden causar la formación de MN a través de rearrreglos cromosómicos, expresión alterada de los genes o aneuploidías, se han asociado con el desarrollo del cáncer [90]; la relación entre la inducción de MN y el desarrollo del cáncer se soporta a través de las siguientes observaciones: la primera, la alta frecuencia de MN que presentan las células de pacientes con cáncer que no han sido tratados y en sujetos con cáncer de origen hereditario, por ejemplo el síndrome de Bloom o ataxia telangiectasia [28]; la segunda observación, es la frecuencia elevada de MN en células de la mucosa oral, ha sido usada como biomarcador de cáncer en pruebas de quimiopreención clínica [91]; la tercera, es la correlación existente entre los agentes genotóxicos que inducen MN y carcinogenicidad, como por ejemplo las radiaciones ionizantes y los rayos UV [92], y por último en cuarto lugar, la correlación inversa entre la frecuencia de MN y la concentración de ciertos nutrientes en la sangre que se asocian a la reducción del riesgo de cáncer como por ejemplo el folato, calcio, vitamina E y ácido nicotínico [93]. El estudio de Bonassi y colaboradores en el 2007 [94-96], muestran evidencias basadas en la correlación mecanística y experimental existente entre alteraciones (AC) y MN, se encontraron en estudios de cohorte, los cuales demuestran que la frecuencia de AC en linfocitos de sangre periférica en pacientes saludables, es un predictor de riesgo de cáncer al igual que la asociación con el incremento en la frecuencia de MN y el riesgo a desarrollar cáncer de estómago, seno, urogenital y gastrointestinal.

5.12 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN EL BIOMONITOREO HUMANO

La Epidemiología Molecular surge del interés de la investigación para la prevención de la enfermedad causada por la exposición ambiental/ ocupacional; para ello emplea herramientas de la epidemiología clásica como historias y cuestionarios incluyéndose también biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad (genética y adquirida) [67], con el objetivo de identificar la interacción gen-ambiente, predecir riesgos de salud asociados con exposición, identificar individuos y poblaciones susceptibles y con riesgo a desarrollar problemas de salud, esto con el fin de proponer políticas y estrategias de intervención para la prevención temprana de potenciales riesgos de salud como el cáncer; puesto que se enfoca principalmente en la etiología, susceptibilidad

genética y mecanismos para la inducción de enfermedades. La epidemiología molecular integra los campos de la epidemiología clásica y metodologías de laboratorio *in vitro* e *in vivo* en diferentes disciplinas como la citogenética, biología molecular, biología celular, entre otras [39].

Los biomarcadores han incrementado su importancia en los estudios epidemiológicos al sustentar con más exactitud la evaluación de la exposición, y sus efectos precoces, para observar y analizar el riesgo que presentan algunas poblaciones de adquirir problemas de salud, no sólo debido a factores ambientales si no también a variantes genéticas o polimorfismos que representan la fase intermedia de continuidad entre la exposición y la enfermedad que son útiles para la epidemiología molecular. Las herramientas del biomonitoreo, pueden ser usadas para identificar exposiciones peligrosas a agentes potencialmente dañinos antes que se manifiesten los efectos adversos en la salud de la población. Algunos grupos de la población monitoreada pueden ser utilizados para hacer inferencias de la exposición en toda la población teniendo en cuenta factores de susceptibilidad genética de dichas poblaciones que permiten mostrar una limitación inherente o adquirida en la habilidad del organismo para responder a las exposiciones a una sustancia específica [97].

Las técnicas de biología molecular han revolucionado las oportunidades de investigación en toxicología y epidemiología. Recientes estudios epidemiológicos ocupacionales han permitido asociar exposición a un agente causal (exposición ocupacional específica) y la enfermedad, de igual manera se ha logrado establecer que la toxicología presenta un enorme potencial para la prevención de la enfermedad, por lo tanto asociación entre la toxicología y las enzimas claves que activan o inactivan los xenobióticos están permitiendo identificar los rasgos genéticos individuales que pueden influenciar el desarrollo del cáncer. Los biomarcadores innatos, de susceptibilidad adquirida, biomarcadores de respuesta y susceptibilidad han sido validados por su especificidad, sensibilidad y capacidad para identificar para distinguir los individuos que estén en riesgo y los que no, relacionar todos estos factores es lo que ha permitido el éxito y la aplicabilidad de la epidemiología molecular [72].

6 ANTECEDENTES

Al realizar una minuciosa búsqueda en las bases de datos disponibles en la Internet; como Hinari, Science Direct, Medline, ISI Web of knowledge; no se encontraron estudios previos que relacionen el polimorfismo del gen OGG1h Ser326Cis y la genotoxicidad de los solventes orgánicos medida a través de la frecuencia de micronúcleos, en personas expuestas ocupacionalmente, específicamente al tiner y sus componentes. A continuación se describen algunos estudios que involucran metodologías y conceptos claves en la presente investigación.

6.1 BIOMONITOREO DE POBLACIONES EXPUESTAS A SOLVENTES ORGÁNICOS

Gran número de estudios poblacionales sobre la exposición de origen ocupacional a agentes conocidos como tóxicos, incluyen pruebas citogenéticas o biomarcadores como herramientas que son ampliamente usadas para el biomonitoreo humano y de esta manera, permitir la identificación de los efectos biológicos por la exposición a químicos genotóxicos en trabajadores industriales, a través de la medición de las alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica; uno de estos estudios menciona que el incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas en humanos es debido a la exposición ocupacional a agentes químicos genotóxicos, como el benceno [98].

El monitoreo de la concentración del tolueno en el aire ha promovido el desarrollo del biomonitoreo en años recientes, siendo éste un gran predictor potencial de riesgo en la salud individual por exposición al tolueno [99]. Niveles ambientales de tolueno en áreas urbanas y en general en poblaciones expuestas a valores, aproximadamente, 10 veces menor a los valores de referencia establecidos por la EPA para déficit neurosensorial, provee un amplio margen de protección en situaciones de exposición continua. Sin embargo, esta estrecha diferencia con los niveles de tolueno a nivel interno, los cuales exceden los niveles externos de 3 a 8 veces, sugiere que la población presenta una capacidad limitada para metabolizar el tolueno, por ello se hace necesario evaluar los polimorfismos de las enzimas del metabolismo en diversos grupos raciales [100].

Se ha logrado establecer que los solventes orgánicos que contienen tolueno como el tiner, además del daño en el ADN, tienen efecto inhibitorio sobre la liberación de gonadotropina actuando sobre los niveles de la pituitaria. Previamente se ha

observado que estos solventes inhiben la secreción de gonadotropina en paralelo con los niveles de testosterona circundante, es claro que la inhalación de pintura con tñer incluso a bajas concentraciones, inhibe la síntesis y secreción de testosterona por efecto directo sobre las células de Leydig [101].

6.2 POLIMORFISMO DEL GEN OGG1h, FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y POBLACIONES EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE

Estudios de genotoxicidad del benceno y sus metabolitos en poblaciones expuestas que utilizan el biomarcador de exposición intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y biomarcador de efecto como Micronúcleos (MN), concluyen que el benceno actúa como clastógeno. Además demuestran que hay disponibilidad de datos de estudios que indican que el benceno y sus metabolitos in vivo e invitro presentan genotoxicidad, tanto en humanos como en animales, dentro de los rangos de los biomarcadores examinados [3].

Uno de los estudios en los cuales se mide la actividad del gen OGG1h es el realizado en una población expuesta ocupacionalmente en Bélgica, donde se observó un incremento en la frecuencia de MN en células binucleadas de la población expuesta en comparación con la población control y además se asoció la baja actividad de reparación del daño en el ADN del estado del gen polimórfico que codifica a la proteína polimórfica OGG1h-Cis³²⁶, comparada con el tipo silvestre OGG1h-Ser³²⁶ [102].

La influencia de los genotipos sobre los biomarcadores de genotoxicidad en trabajadores expuestos al cobalto o a metales pesados se pudo observar a través del incremento de la frecuencia de micronúcleos en células mononucleares, frecuencia que puede ser dependiente de la actividad de la variante polimórfica del gen OGG1h - Cis³²⁶ [55].

En cultivos *in vitro* de células en sangre periférica, se indujo daño en el ADN y micronúcleos en células binucleadas (MNCB), agregando tres agentes diferentes: óxido de etileno (EO), óxido de estireno (SO) y sometiendo a radiación gama (G) separadamente. Los micronúcleos en células mononucleares no muestran dosis-dependencia para cualquiera de los tres agentes, a diferencia de las MNCB que mostraron dosis-dependencia en las células expuestas a G y SO. La diferencia con el tratamiento de EO no induce efectos significativos sobre MNCB. Para cada agente por separado se muestra un gran daño en el ADN en células con genotipo homocigoto polimórfico OGG1h³²⁶ (Cis/Cis) comparado con el tipo silvestre OGG1h³²⁶ (Ser/Ser) (Ver tabla 4) [61].

6.3 ACTIVIDAD DEL GEN OGG1h Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER Y OTRAS ENFERMEDADES DEGENERATIVAS

Un estudio realizado en Tampa, Florida (Estados Unidos) demostró que el genotipo 326Cis/326Cis, está asociado con el incremento de riesgo a desarrollar cáncer orolaríngeo, en consumidores de alcohol comparado con los no consumidores, esto sugiere que los aductos de 8-OH dG pueden estar involucrados y relacionados con la tumorigénesis del cáncer orolaríngeo [22].

Un estudio poblacional caso-control realizado en Honolulu, se encontró que el riesgo de sufrir cáncer de pulmón se incrementa en aproximadamente el doble en individuos con la variante del genotipo homocigoto OGG1 Cis/Cis, comparado con el genotipo silvestre Ser/Ser, esta asociación fue observada para sexo, grupo étnico y tipo celular analizado [103].

El polimorfismo del gen OGG1h Ser326Cis es asociado con riesgo de pterigio en población china; además, se considera que el pterigio es un cambio neoplásico, y por su etiología es necesario utilizar biomarcadores de susceptibilidad como polimorfismos genéticos en genes de reparación que puedan tener efectos sobre las rutas de reparación del ADN o de reacciones foto-oxidativas, para así poder definir el alto riesgo a desarrollar esta enfermedad [25].

Otro estudio sugiere que existe una significancia estadística para la interacción medioambiental entre el genotipo Ser326Cis del gen OGG1h y la gastritis atrófica. Esta conclusión sugiere que quien tiene gastritis atrófica con genotipo Ser/Cis o cys/cys presenta alta susceptibilidad a desarrollar cáncer gástrico [21].

Una revisión realizada en el año 2005 muestra que sólo 3 de 14 estudios de genotipos-fenotipos sugieren un impacto de variación en Ser326Cis sobre los niveles de 8-OH dG y la reparación de estas lesiones. La mayoría de estos estudios se centran en observar las diferencias significativas en los niveles de 8-OH dG con el genotipo OGG1h, el cual es consistente con un modesto efecto. La evidencia epidemiológica es inconsistente, pero provee alguna evidencia de una asociación entre la variación polimórfica in OGG1h y riesgo de cáncer esofageal, pulmón, nasofaríngeo y orolaríngeo [58]. Otra investigación desarrollada recientemente en una población italiana demostró, que existe contribución del polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1 en el desarrollo de la Esclerosis Lateral Amiotrófica en hombres (Ver tabla 5)[104].

Tabla 5. Relación de estudios que involucran polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h.

Tipo de Polimorfismo	Tripleta	Codón	Asociación-Interacción	Población	Autores
Polimorfismo de un simple nucleótido.	TCC-TGC Ser Cis	326	Frecuencia MN	Bélgica	Aka et al; 2004
			Frecuencia MN	Bélgica	Mateuca, et al
			Aumento de daño en el ADN	Bélgica	Godderis et al; 2006
			Cáncer de pulmón	Japonesa	Sugimura et al 1999
			Cáncer esofageal	Japonesa	Xing et al, 2001
			Cáncer de estomago	Japonesa	Hanaoka et al, 2001
			Cáncer de pulmón	Hawai	Marchand et al; 2002
			Cáncer de próstata	Estados Unidos	Xu et al, 2002
			Cáncer Nasofaríngeo	Taiwán	Cho et al, 2003
			SCCHN	Estados Unidos	Zhang et al, 2004
			Pterigio	China	Kau et al; 2004
			Esclerosis Lateral Amiotrófica	Italia	Coppedè et al 2007

7 METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio epidemiológico molecular de tipo transversal o *Cross Sectional*, en una población expuesta a solventes orgánicos y su grupo referente. Se emplearon herramientas de epidemiología clásica tales como cuestionarios, de los cuales se obtuvo la información sobre la historia clínica, familiar y laboral, y herramientas de la epidemiología molecular como biomarcadores de efecto (micronúcleos) y de susceptibilidad (polimorfismo del gen de reparación). Basados en la información de los cuestionarios se identificaron las variables del estudio (Ver tabla 6)

Tabla 6. Descripción de Variables del estudio.

Variables	Cód	Tipo de variable	Naturaleza	Nivel de medición	Análisis estadístico	
Genotipo	Ser/Ser	0	Independiente	Cualitativa	Nominal	ANOVA factorial univariada
	Ser/Cis	1				
	Cis/Cis	2				
Exposición	Expuesto	3	Independiente	Cualitativa	Nominal	Levene Pearson
	No Expuesto	4				
Tiempo de exposición	5	Independiente	Cuantitativa	Razón	Spearman Kruskal-Wallis	
Edad	6	Independiente	Cuantitativa			
Frecuencia de MN	7	Dependiente	Cuantitativa			

7.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio estuvo constituida por un grupo de trabajadores expuestos a solventes orgánicos, específicamente en los talleres del sector informal de la pintura de automotores, en algunos municipios del departamento del Cauca como Popayán, Piendamó, Timbío, El Tambo, El Bordo y Puerto Tejada, y por un grupo no expuesto o referente conformado por profesores, administrativos y estudiantes de la Universidad del Cauca.

7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Se visitaron diferentes talleres de pintura de carros del departamento del Cauca, motivando a la participación voluntaria en el estudio de los trabajadores expuestos a solventes orgánicos; e informando acerca de las ventajas de la participación en el estudio además de la participación en capacitaciones dirigidas por el Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. Se realizó una encuesta corta (ver anexo A), diseñada para obtener información de acuerdo a los criterios de inclusión como: ser personas saludables, estar expuesto a solventes orgánicos, presentar un tiempo mínimo de exposición de 5 años, tener un rango de edad entre 18 y 55 años, y los criterios de exclusión como ser fumador, haber sido hospitalizado en los últimos tres meses, haber sido irradiado, estar expuestos a otras sustancias químicas consideradas peligrosas, presentar una historia clínica o familiar con antecedentes de enfermedades de carácter hereditario o cáncer y que consumieran algún tipo de medicamento periódicamente. El grupo referente fue escogido teniendo en cuenta los mismos criterios de selección, excepto la exposición ocupacional a solventes orgánicos.

7.4 GRUPOS DE ESTUDIO

Una vez realizadas las encuestas cortas se seleccionaron las personas que cumplieran con los criterios de inclusión y de exclusión en ambos grupos de estudio. Se escogieron 50 personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos y 50 personas no expuestas como grupo referente. Luego de la selección de los grupos de estudio se realizó una encuesta larga (ver anexo B), para completar las características de los individuos y posteriormente firmar el consentimiento informado donde se dió a conocer los objetivos, ventajas y riesgos de la participación en el estudio (ver anexo C).

7.5 TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE

Posterior a la firma del consentimiento informado y utilizando las medidas de bioseguridad por personal capacitado, se tomaron las muestras de sangre periférica, por venopunción con vacutainer en dos tubos de ensayo, en el primero se tomaron 5ml de sangre con anticoagulante EDTA para la extracción de ADN y posterior identificación del polimorfismo del gen OGG1h y en el segundo tubo se tomaron 5ml de sangre total con anticoagulante Heparina para la prueba de micronúcleos.

7.6 AISLAMIENTO DE LINFOCITOS Y EXTRACCIÓN DE ADN

Para el aislamiento de linfocitos, se tomó del tubo con anticoagulante EDTA 5ml de sangre total y se transfirió a un tubo de centrifuga Falcón con Histopaque a temperatura ambiente en relación de 1:1, se centrifugó a 2600 r.p.m por 30 minutos. Se depositaron los linfocitos a un tubo Falcón nuevo, y se lavaron con solución Buffer Fosfato Salino (PBS), centrifugándose a 1200 r.p.m durante 12 minutos; de los linfocitos completamente limpios se extrajo el ADN usando el kit de QIAGEN. A la solución que contenía los linfocitos se le agregó 20 μ L de proteinasa K, luego, se adicionaron 200 μ L del buffer de lisis, y se incubaron a 70° C durante una hora, pasado el tiempo de incubación se agregaron 200 μ L de etanol; 700 μ L de la solución se transfieren a una columna de extracción y se centrifugan a 10.000 r.p.m por 3 minutos; descartando el precipitado y adicionando 500 μ L del buffer AW1, se centrifuga a 10.000 r.p.m por 2 minutos, nuevamente se descarta el precipitado, y se adicionan 500 μ L del buffer y se centrifugan a 14.000 r.p.m por 3 minutos; en este paso se elimina el tubo bajo la columna, se coloca un tubo nuevo y se adiciona 200 μ L del buffer AE, se deja reposar a temperatura ambiente por 60 segundos y finalmente se centrifuga a 8.000 r.p.m por 2 minutos. El precipitado que contenía el ADN se transfirió a un tubo de criopreservación, se rotuló para su posterior genotipificación y se almacenó a una temperatura de -20°C.

7.7 ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR Y DE LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS POR RFLP´S

Se estandarizaron los protocolos de las pruebas de PCR y RFLP´S para amplificar e identificar el polimorfismo del gen 8 Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) Ser326Cis exón 7, partiendo de los protocolos establecidos por Mateuca *et al*, Aka *et al* y Godderis *et al* [55, 102, 105]. Durante el desarrollo de la estandarización se observó la presencia de bandas inespecíficas de aproximadamente 60 pb en el transcurso de la PCR y de Los RFLP´S, lo que generó la realización de una curva de magnesio (Mg) de 2 μ l a 1.0 μ l, 1.5 μ l, 2.5 μ l, 3 μ l, 3.5 μ l y 4 μ l, esta curva no permitió observar ningún cambio favorable, se optó entonces por mantener la concentración inicial de Mg y se procedió a disminuir la cantidad de primers de 1 μ l a 0.5 μ l, observándose una considerable disminución de las bandas, finalmente se aumenta la temperatura de alineamiento de primers de 60° C a 62° C, lo que permitió la desaparición de las bandas inespecíficas y facilitar la lectura de los amplificados del gen OGG1h.

Las condiciones de los RFPL´S variaron con respecto a los protocolos guía, en el tiempo de digestión de 1 hora y 30 minutos a 6 horas, después de los cambios

anteriormente mencionados, se pudieron observar los patrones de bandas correspondientes al gen OGG1h exón 7 completamente claros. Las condiciones para el desarrollo de la PCR y de los RFLP'S.

7.8 GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h).

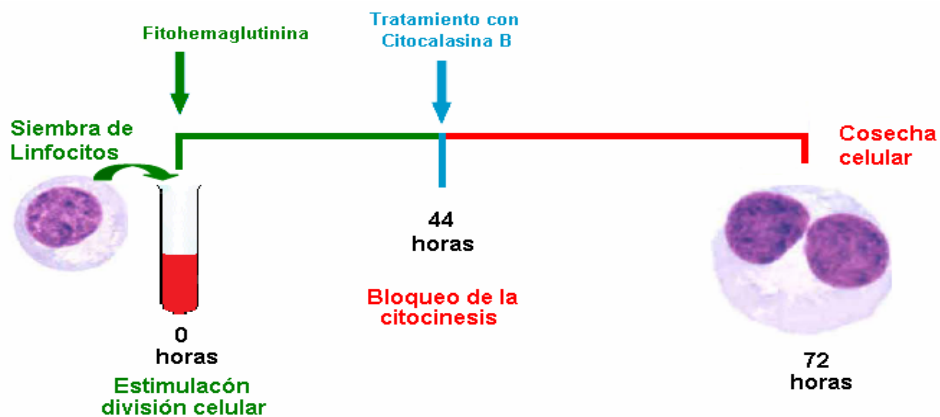
La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen de 25 µl utilizando 1.5 µl de ADN criopreservado; Taq polimerasa 0.1 µl a una concentración de 0.02 U/ µl (Promega); 0,5 µl; de cada uno de los cebadores o *primers* (*Forward* 5': 5'- CCC AAC CCC AGT GGA TTC TCA TTG C-3', *Reverse* 3': 5'-GGT GCC CCA TCT AGC CTT GCG GCC CTT); 2 µl de MgCl₂ a una concentración de 2mM (Promega); 1.25 µl de dNTPs a 0,1 mM (Invitrogen); 5 µl de Buffer 5X Green (Promega), y 14.15 µl de agua desionizada (Sigma). Las siguientes son las condiciones para la PCR: el primer ciclo: desnaturalización inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos cada uno dividido en tres etapas: desnaturalización del ADN 30 segundos a 94 °C, alineación de cebadores 30 segundos a 62 °C, extensión 90 segundos a 72 °C, y el ciclo final de extensión 5 minutos a 72 °C. Para la observación del producto amplificado se realizó la electroforesis en gel de agarosa (Nusieve) al 1.5% y bromuro de etidio a 0.2 µg/ml de concentración, por 30 minutos a 80V. Como producto final de la PCR se observó un fragmento de 234 pb que corresponde a la amplificación del gen OGG1h.

Para la identificación del polimorfismo del gen OGG1h Ser 326 Cis, se tomaron 10 µl del producto amplificado, que fueron digeridos con 1 µl de enzima de restricción Sat I (Fnu 4HI) (Fermentas), en 2 µl de Buffer 10 X G (Fermentas) con 12 µl de agua desionizada (Sigma), durante 6 horas a 37° C. La separación de los productos digeridos se realizó en gel de agarosa (Metaphor) al 3% con bromuro de etidio a una concentración 0.2 µg/ml y corrimiento por electroforesis durante 15 minutos a 40V y 30 minutos a 80V. El gel que contenía el patrón de bandas obtenido se observó mediante un transiluminador UV. Los genotipos observados fueron clasificados de la siguiente manera: el genotipo silvestre Ser/Ser presentó un banda de 213 pb, el heterocigoto polimórfico Ser/Cis con un patrón de bandas de 213 pb, 164pb y 49pb y finalmente el homocigoto polimórfico Cis/Cis con bandas de 164 pb y 49 pb; en todos los genotipos se observó un fragmento invariante de 21 pb. Finalmente se tomaron las fotografías correspondientes y se realizaron los registros de datos para su posterior análisis.

7.9 PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS CON BLOQUEO DE CITOCINESIS

Para el desarrollo de la prueba de micronúcleos se tomaron 3 ml de sangre total, y se agregaron 0.5 ml a cada tubo para realizar 2 cultivos de 5 ml por persona; cada cultivo contenía 4.5 ml de medio RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina al 1%, suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%. Los linfocitos se estimularon a dividirse con 0.1 ml de fitohemaglutinina al 2%, los cultivos fueron llevados a una incubadora a una temperatura de 37°C por 72 horas; pasadas las 44 horas de iniciado el cultivo celular, a cada cultivo se le agregó 0.2 ml de citocalasina B a una concentración de 6 µg/ml; transcurridas las 72 horas se realizó la cosecha celular (Ver figura 10) así: se centrífugo cada cultivo a 1000 r.p.m. durante 5 minutos, se removió el sobrenadante y se resuspendieron las células, se agregó a los cultivos 3 ml de solución hipotónica de KCL al 0.075 M por tres minutos; luego se fijaron con 1ml de metanol y ácido acético glacial (3:1) (Carnoy`s) bien frío; se adicionaron 2 ml mas de Carnoy`s y se resuspendió suavemente. Se procedió a centrifugar a 1000 r.p.m. durante 5 minutos, se remueve el sobrenadante, se resuspenden las células suavemente se adicionan 5 ml de fijador Carnoy`s, se centrifuga nuevamente a 1000 r.p.m. por 5 minutos, este procedimiento se repitió dos veces mas, el goteo se realizó en placas portaobjetos de vidrio. Después de 48 horas de goteo las células fueron coloreadas sumergiendo las placas en Giemsa al 6% durante 7 min., pasadas 72 horas de coloreadas fueron preservadas con entellan para su posterior lectura y registro. Cada placa fue rotulada con doble ciego para evitar sesgos en la obtención de los resultados, las células binucleadas se observaron en microscopio óptico en objetivo de 40X; de los mejores registros se tomaron fotografías. El conteo y registro de micronúcleos se efectuó en 2000 células binucleadas por individuo, pero la frecuencia se expresó en 1.000 células, teniendo en cuenta los criterios de selección para su registro establecidos por Fenech *et al* [90].

Figura 10. Protocolo prueba de Micronúcleos (MN)



Para las células binucleadas se tuvo en cuenta que el citoplasma se distinguiera claramente, que las membranas nuclear y citoplasmática se encontraran intactas, podían tocarse con otras células pero no solaparse, los núcleos podían estar unidos por puentes núcleo- plasmáticos, los núcleos debían presentar igual tamaño, forma, patrón de tinción y grado de condensación de la cromatina; ninguno de los núcleos debería encontrarse en etapas de apoptosis. Para los micronúcleos se tuvo en cuenta que su diámetro oscilara entre $1/16$ - $1/3$ de la medida del diámetro del núcleo principal, debían tener la misma Intensidad de tinción que los núcleos principales, no debían estar conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada, podían tocarse con los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse con ellos. [90].

7.10 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de asociación para los grupos (expuesto y referente) vs. el genotipo y fenotipo, se hizo con tablas de contingencia y con la prueba de significancia estadística Chi-cuadrado de Pearson (X^2).

La identificación de las frecuencias alélicas, se realizó mediante las fórmulas Serina: (Frecuencia Relativa Ser-Ser) + $\frac{1}{2}$ (Frecuencia relativa Ser-Cis), Cisteína: 1- Frecuencia Serina; a partir de las frecuencias genotípicas obtenidas de los datos registrados para los individuos de ambos grupos de estudio.

Los datos de micronúcleos no cumplieron con los requisitos de normalidad (Kolmogorov Smirnov, $p < 0.05$), ni de homogeneidad de varianza (Levene, $p < 0.05$), el análisis comparativo entre los grupos, se efectuó mediante la prueba paramétrica ANOVA de un factor; ya que en muestras grandes con $n \geq 30$ sus promedios se ajustan a la distribución normal [106].

Para identificar la interacción entre el factor principal de esta investigación (exposición) y otros factores como: genotipo, fenotipo y consumo de alcohol; se aplicó el análisis de Varianza Factorial (prueba paramétrica).

Para la identificación del fenotipo las personas que presentaron genotipo homocigoto Ser-Ser fueron clasificadas como individuos con fenotipo silvestre, las personas con genotipo heterocigoto Ser-Cis y genotipo homocigoto Cis-Cis fueron clasificadas como individuos con fenotipo mutante.

El análisis de asociación entre la frecuencia de micronúcleos y las variables cuantitativas como: edad y tiempo de exposición; se realizó mediante el análisis de correlación de Pearson y curva del mejor ajuste.

Todas pruebas se realizaron con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.

En la tabla 7 son reportadas las características y su distribución en la población objeto de estudio, observándose que existe un sesgo en el consumo de alcohol en los grupos de estudio (X^2 , $p=0.003$), además es claro que los individuos de la población han sido correctamente emparejados con respecto a la edad.

Tabla 7. Características de la población objeto de estudio.

Variables	Expuestos	Referentes	Total	p.
No de individuos	n (%)	n (%)	n (%)	
	50 (50)	50 (50)	100 (100)	
Consumo de alcohol				
No consume	15 (30)	22 (44)	37 (37)	0,003 *
Consume	35 (70)	28 (56)	63 (63)	
Edad ($X \pm DE$)	38,48 (10,931)	37,3 (9,573)	37,89 (10,239)	0,315**
Tiempo de exposición				
0-20	31(62)	0	31(62)	0.000
20-25	11(22)	0	11(22)	
>25	8(16)	0	8(16)	

* Chi cuadrado Pearson (X^2), ** ANOVA de un factor

8.2 GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 (OGG1H) EN HUMANOS, EN LA POBLACION OBJETO DE ESTUDIO

La distribución de los genotipos del polimorfismo del gen de reparación en la población analizada se ajusta al equilibrio Hardy-Weinberg con una significancia estadística $X^2 > 0.05$ ($p=0.423$), es decir, no se está manifestando ninguna presión de selección sobre los genotipos, ni en contra ni a favor (Ver tabla 8). En la figura 11, se puede observar los productos amplificados de 234pb del gen OGG1h, al igual que los productos digeridos para el polimorfismo Ser326cis, exón 7.

Figura 11 a. Productos amplificados por PCR del gen OGG1h (234pb), **b.** Productos de la digestión por la enzima Sat I (Fnu 4HI), se identifica lo siguiente: *poso 1*: marcador molecular; *poso 2*: genotipo homocigoto mutante (Cis-Cis)

patrón de bandas 164, 49, 21 pb; posos 3, 4, 6, 8, 10: genotipo heterocigoto mutante con patrón de bandas 213, 164, 49, 21 pb; posos 5, 7, 9, 11, 12, 13: genotipo homocigoto silvestre con patrón de bandas 213 y 21 pb.

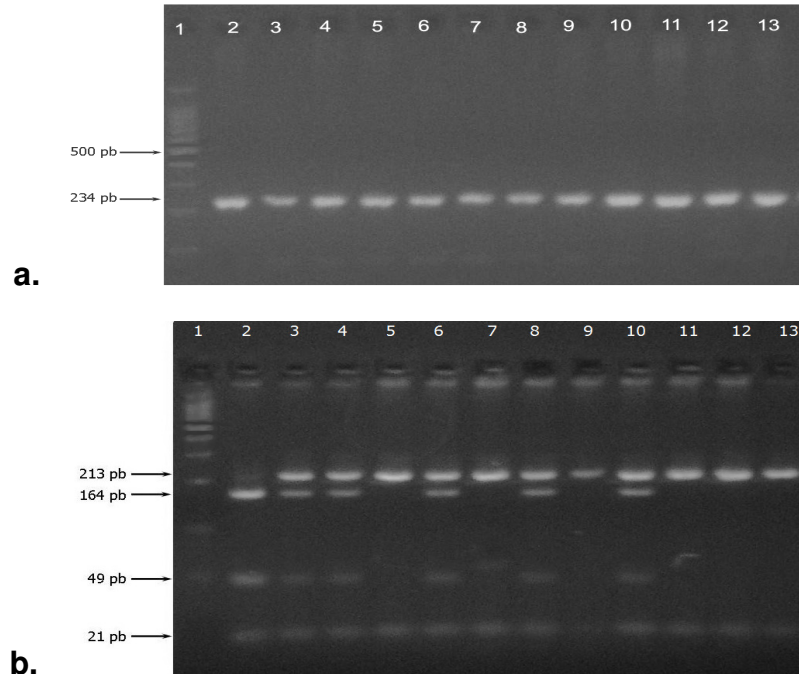


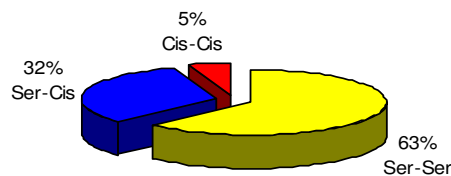
Tabla 8. Distribución del genotipo en la población objeto de estudio.

Genotipo	Expuestos n (%)	Referentes n (%)	Total n (%)	p
Ser-Ser	34 (68)	29 (58)	63 (63)	0,423*
Ser-Cis	13 (26)	19 (38)	32 (32)	
Cis-Cis	3 (6)	2 (4)	5 (5)	

* Chi cuadrado Pearson (X^2)

La figura 12 representa las frecuencias genotípicas del gen OGG1h, en el cuál se puede observar que el mayor porcentaje pertenece al genotipo Ser-Ser con el 63%, mientras que el genotipo Ser-Cis representa aproximadamente la mitad con el 32%. El genotipo menos frecuente fue el Cis-Cis con el 5%.

Figura 12. Distribución de genotipos en la población objeto de estudio.



Con base en las frecuencias genotípicas antes mencionadas, se establecieron las frecuencias fenotípicas: silvestre (Ser-ser) 63% y mutante (Ser-Cis y Cis-Cis) 37% en la población total (n=100). Tampoco se observa presión de selección para algún fenotipo, con una significancia estadística $X^2 > 0.05$ ($p=0.408$) (Ver tabla 9). Las frecuencias alélicas poblacionales identificadas fueron: alelo serina con un 79% (dominante) y alelo Cisteína 21% (recesivo). Entre las frecuencias genotípicas y los grupos no se identificó asociación (Chi-cuadrado de Pearson 1.722, $gl=2$, $p=0.423$) es decir, que los genotipos se distribuyen aleatoriamente entre los grupos (expuestos y referentes).

Tabla 9. Distribución del fenotipo en la población objeto de estudio.

Fenotipo	Expuestos	Referentes	Total	p.
	n (%)	n (%)	n (%)	
Silvestre (Ser-Ser)	34 (68)	29 (58)	63 (63)	0.408*
Mutante (Ser-Cis y Cis-Cis)	16 (32)	21 (42)	37 (37)	

* Chi cuadrado Pearson (X^2)

8.3 FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

El análisis y registro de micronúcleos se efectuó en 2000 células binucleadas por individuo, pero la frecuencia se expresó en 1.000 células, teniendo en cuenta los criterios de selección establecidos por Fenech *et al* [90]. En la tabla 10, se reportan las frecuencias de micronúcleos identificadas para el grupo expuesto y el grupo referente; se observa claramente que el grupo expuesto presenta una frecuencia de micronúcleos significativamente superior al encontrado en el grupo referente (ANOVA, $gl=1$, $F=7.222$, $p=0.008$). En la figura 13 se pueden observar algunas fotografías de células binucleadas con daño cromosómico expresado como micronúcleo.

Tabla 10. Frecuencia de micronúcleos respecto al los grupos de estudio

Grupo	Frec. Micronúcleos /1000Células Binucleadas			p
	Expuestos (n=50)	Referentes (n=50)	Total (n=100)	
Total	$X \pm EE$	$2.67 \pm (0,717)$	$1.47 \pm (0,532)$	-
				0,008**

**Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para el grupo

Figura 13. Fotografías de linfocitos de sangre periférica. **a. b. c.** Célula binucleada con uno, dos y tres micronúcleos respectivamente.



8.4 INTERACCIÓN ENTRE GENOTIPOS, FENOTIPOS DEL GEN OGG1h Y LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.

Se pudo establecer que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los genotipos y la frecuencia de micronúcleos al interior de cada grupo de la población (ANOVA, $p=0,509$), al igual que no existe interacción entre el genotipo, los grupos (expuestos-referentes) de estudio y la frecuencia de micronúcleos (ANOVA, $p=0,551$), respecto de la interacción entre los fenotipos y la frecuencia de micronúcleos tampoco existe diferencia estadísticamente significativa (ANOVA, $p=0.442$) (Ver tabla 11).

Tabla 11. Frecuencia de micronúcleos respecto al genotipo y fenotipo de los grupos de estudio.

Grupo	Frec. Micronúcleos /1000Células Binucleadas			p
	Expuestos (n=50)	Referentes (n=50)	Total (n=100)	
Genotipo	Ser-Ser	2.93	1.36	0,509*
	Ser-Cis	2.46	1.685	
	Cis-Cis	0.665	1.00	
Fenotipo	Silvestre	2.93	1.36	0.442***
	Mutante	2.0	1.61	
Total	X±EE	2.67 ± (0,717)	1.47 ±(0,532)	-
p		0,008**		0,551****

*Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para el genotipo.

**Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para el grupo.

*** Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para el Fenotipo

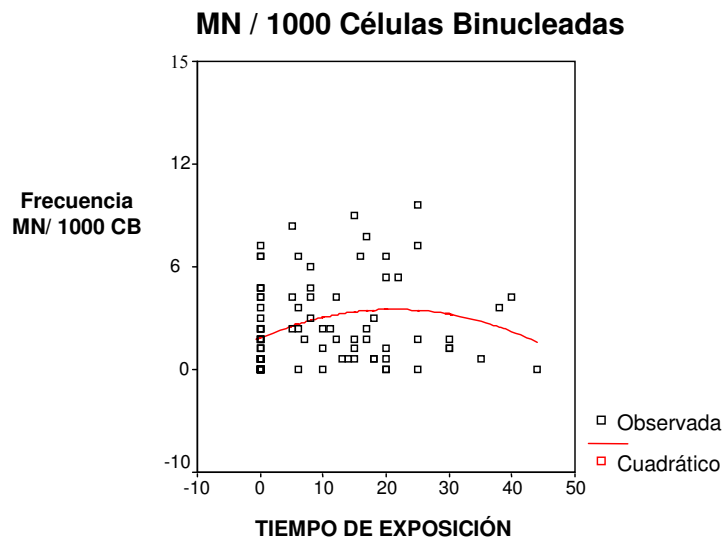
**** Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para la interacción entre el genotipo y los grupos.

8.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS, LA EDAD Y EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN

No se observó una correlación significativa entre la edad de los individuos de la población y la frecuencia de micronúcleos (Análisis de Varianza Univariante, $gl=1$, $F=0.330$, $p=0,457$).

Se observó una correlación curvilínea de tipo cuadrática, estadísticamente significativa, entre la frecuencia de micronúcleos y el tiempo de exposición, la ecuación que describe tal asociación es: $(1.5390 + (0,1307 \times TE) + (-0,0031 \times TE^2))$. Sin embargo, dicha asociación no es muy fuerte, ya que la variabilidad observada en la frecuencia de micronúcleos sólo deja ver un 6.5% de la variabilidad observada en el tiempo de exposición ($R^2=0.065$, $p=0.038$) (ver figura 14).

Figura 14. Correlación cuadrática entre la frecuencia de micronucleos y el tiempo de exposición.



Variable dependiente	Ecuación	R^2	d.f.	F	Sig	B_0	B_1	B_2
MN / 1000 Células Binucleadas	Cuadrática	0,065	97	3,38	0,038	1.5390	0,1307	-0,0031

8.6 INTERACCIÓN ENTRE EL CONSUMO DE ALCOHOL Y LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN LA POBLACION OBJETO DE ESTUDIO.

La prueba de Chi-cuadrado de Pearson, permitió inferir que existe diferencia estadísticamente significativa en la distribución del consumo de alcohol en los grupos de estudio (11.494, gl=2, p=0.003); se observó un mayor hábito de consumo del alcohol en el grupo expuesto frente al grupo referente.

En la tabla 12 se reporta el análisis para la interacción entre el consumo de alcohol y los grupos (expuesto y referente), respecto a la frecuencia de micronúcleos, observándose que el consumo de alcohol por si sólo no influye significativamente (gl=1, F=0.885, p=0.349), pero si es significativa su interacción con los grupos de estudio (expuesto y referente) (gl=1, F=8.108, p=0.005) Se observa claramente que en los individuos expuestos y además consumidores de alcohol la frecuencia de micronúcleos se eleva considerablemente respecto de los no consumidores.

Tabla 12. Interacción entre los grupos de estudio, consumo de alcohol y la frecuencia de micronúcleos.

Consumo de Alcohol	Frec. Micronúcleos /1000Células Binucleadas			p
	Expuestos (n=50)	Referentes (n=50)	Total (n=50)	
NO (0 a 3 veces x año)	1.465	1.955	1.71	0,349*
SI (≥1 veces x mes)	3.185	1.17	2.335	
X±EE	2.67 ± (0,717)	1.47 ±(0,532)		
p	0,008**			0,005***

*Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para el hábito de consumo de alcohol.

**Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para el grupo.

***Significancia estadística mediante ANOVA -factorial para la interacción entre el consumo de alcohol y los grupos.

9 DISCUSIONES

La exposición de origen ocupacional a solventes orgánicos ha sido asociada a enfermedades respiratorias y hematológicas por exposición prolongada a benceno; déficit neurosensoriales e inhibición de la liberación de gonadotropina se han visto asociadas con la exposición al tolueno [98, 99]. La exposición constante a estos químicos ha sido relacionada con el incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas, observadas en linfocitos de sangre periférica en humanos [99]. Se sabe que durante el metabolismo de los químicos como los solventes orgánicos se producen especies reactivas de oxígeno que interactúan con el ADN causando daño oxidativo, este daño puede causar lesiones como sitios abásicos y rupturas de cadena sencilla las cuales son consideradas como un evento inicial en los procesos de mutagénesis, si estas lesiones no son reparadas por los mecanismos especializados, modulados por genes de reparación, las lesiones permanecen y en el momento de la replicación del ADN las rupturas de cadena sencilla se convertirán en rupturas de cadena doble, que podrán ser observadas como daño cromosómico o micronúcleo.

La capacidad de reparación del ADN esta determinada por la modulación del gen sobre los mecanismos de reparación. Por lo tanto la variabilidad genética y factores como edad y estilo de vida de cada individuo, hace que este sea más o menos susceptible a adquirir enfermedades como el cáncer.

Es relevante identificar la interacción gen-ambiente, para predecir riesgos de salud asociados con la exposición, identificar individuos y poblaciones susceptibles y con riesgo a desarrollar problemas de salud. Para ello la prueba citogenética de micronúcleos ha sido ampliamente usada en estudios epidemiológicos moleculares como biomarcador de daño cromosómico e inestabilidad genómica [7]. El uso de esta prueba en estudios de biomonitorio humano se incrementó en los últimos 15 años, recientes estudios reportados por el proyecto humano de micronúcleos proporcionan gran confiabilidad y herramientas para un mejor análisis de la variabilidad. Los micronúcleos reflejan alteraciones cromosómicas de gran relevancia en los procesos de carcinogénesis [107]. De la misma manera las pruebas moleculares han permitido observar la asociación entre eventos de exposición a agentes químicos y enfermedades, ya que permite identificar la modulación de las enzimas de reparación, mostrando la variabilidad genética de los individuos y su influencia en el desarrollo del cáncer [72].

La estandarización de la prueba molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la amplificación del gen OGG1h, presentó la variación específica de la temperatura de alineación de *primers* y la disminución en la cantidad de los mismos. Inicialmente los protocolos guía establecidos por Mateuca *et al*, Aka *et al*

y Godderis *et al* [55, 61, 102], indicaban la adición de 0.75 μ l de cada primer a una concentración de 0.5 μ M en 25 μ l de reacción y una temperatura de alineamiento de 60^o C, la aparición de bandas inespecíficas de aproximadamente 60 pb, luego de realizar la curva de Mg, que motivó la variación de estos puntos. Específicamente se disminuyó la cantidad de *primers* en 0.5 μ l y se aumentó la temperatura de alineamiento a 62^o C; este cambio permitió la observación en gel de agarosa de los productos amplificados completamente nítidos y sin bandas inespecíficas. Estos cambios optimizan el alineamiento de los *primers* ya que a mayor temperatura y menos cantidad de cebadores se consigue una mayor especificidad evitando la formación de dímeros de *primers*. De acuerdo a lo investigado en la literatura las bandas inespecíficas de bajo peso molecular, son posiblemente originadas por el alineamiento o dímeros de *primers*. Lo anterior permitió realizar sin ningún inconveniente la digestión del ADN amplificado durante 6 horas con la enzima SatI (Fnu 4HI) para la identificación del polimorfismo del gen OGG1h en el codón 326 exón 7 por medio de la prueba molecular de RFLP`S (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción).

Una vez analizados los datos obtenidos se encontró que la distribución de los genotipos del polimorfismo del gen de reparación OGG1h se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para toda la población, a diferencia con lo reportado en una población de la República Checa donde el equilibrio H-W de los genotipos sólo se encontró en el grupo control [108], igualmente el presente estudio reporta las frecuencias genotípicas del polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h en una pequeña población Colombiana así: genotipo Ser-Ser =0,63, genotipo Ser-Cis =0,32 y genotipo Cis-Cis=0,05, estas frecuencias pueden ser comparadas con lo reportado en diferentes estudios poblacionales en el mundo; permitiendo observar diferencias étnicas interindividuales para el polimorfismo estudiado entre la población pionera para Colombia y poblaciones Chinas con Ser-Ser=0.338, Ser-Cis=0,527 y Cis-Cis=0,134, Japonesas con Ser-Ser=0.277, Ser-Cis=0,574 y Cis-Cis=0,149, Norteamericanas con Ser-Ser=0.752, Ser-Cis=0,23 y Cis-Cis=0,018, y Australianas con Ser-Ser=0.399, Ser-Cis=0,565 y Cis-Cis=0,036; y cierta similitud con la distribución de las frecuencias del genotipo en poblaciones de Europa Ser-Ser=0.56, Ser-Cis=0,38 y Cis-Cis=0,06 de Turquía Ser-Ser=0.5, Ser-Cis=0,41 y Cis-Cis=0,09 y de Hungría con genotipos Ser-Ser=0.637, Ser-Cis=0,336 y Cis-Cis=0,027 [4]; esto indica que existe una distribución similar del genotipo silvestre (Ser-Ser) en ambas poblaciones.

En Latinoamérica no existen reportes sobre la distribución genotípica del gen OGG1h, sólo hasta el año pasado en el Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis ambiental [109], se reportaron algunas frecuencias fenotípicas para una población de Brasil, respecto a los fenotipos silvestre con un 60.37% y mutante con un 39,63% (n=106); estos resultados fueron confrontados con las frecuencias obtenidas en esta investigación, las cuales muestran una distribución fenotípica similar con respecto

a la población pionera Colombiana con un 63% para el fenotipo silvestre y con un 37% para el fenotipo mutante, lo que en primera instancia indica una similitud étnica interindividual para este polimorfismo. Las frecuencias reportadas para esta pequeña población Colombiana, nos permite un acercamiento a las frecuencias nacionales.

La interacción del gen OGG1h y la exposición ambiental/ocupacional ha permitido, identificar individuos y poblaciones susceptibles con riesgo a desarrollar problemas de salud como el cáncer, diferentes investigaciones permitieron concluir que los individuos consumidores de alcohol y que presentan el genotipo Cis-Cis están en mayor riesgo a desarrollar cáncer orofaríngeo [22], otro estudio permitió concluir que el riesgo de sufrir cáncer de pulmón se incrementa en aproximadamente el doble en individuos con la variante del genotipo homocigoto OGG1 Cis/Cis, comparado con el genotipo silvestre Ser/Ser [103], además las personas que presentan genotipo Ser-Cis de este mismo gen, están en mayor riesgo de presentar cáncer esofageal, nasofaríngeo [58] y enfermedades como pterigio [110] y esclerosis lateral amiotrófica [104]. Es evidente entonces la significancia biológica del polimorfismo del gen OGG1h.

Los linfocitos de sangre periférica son considerados células centinelas por lo tanto son ideales para identificar lesiones inducidas por agentes genotóxicos, estos se encuentran en estado proliferativo G_0 , lo que nos permite observar lesiones acumuladas por varios años; la constante exposición a agentes genotóxicos induce daño en los linfocitos, que puede ser expresado como alteraciones cromosómicas (AC) en metafase y micronúcleos (MN) en interfase. En la prueba citogenética de micronúcleos se induce la proliferación celular *in vitro* con fitohemaglutinina para que las células que presentan daños debido a la exposición sufridos en G_0 , lo expresen durante la fase de replicación del ADN y puedan ser observados en forma de micronúcleos en células binucleadas interfásicas al bloquear la citocinesis con citocalasina B, lo anterior explica cómo se establece la interacción específica entre la frecuencia de micronúcleos y el grupo de trabajadores expuestos a solventes orgánicos, ya que se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia de MN del grupo expuesto ($\mu=5.34$, $n=50$); y el grupo referente ($\mu=2.94$, $n=50$); por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que indica que si la exposición a solventes orgánicos produce efecto genotóxico y citotóxico se espera observar, un incremento de la frecuencia de micronúcleos en personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos, con relación al grupo referente;. Este incremento fue atribuido a la exposición de origen ocupacional a solventes orgánicos. Los cuales en su mayoría son mezclas de compuestos aromáticos policíclicos como el tñner, capaces de interactuar con el ADN de las células, produciendo una acumulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en su interior y causando el rompimiento de una de las cadenas de ADN, que al no ser reparada eficientemente, en el momento de la replicación, origina una ruptura de cadena doble, que puede ser observada a través de la prueba de micronúcleos.

Un gran número de estudios han relacionado los daños en el ADN como los micronúcleos con la exposición a ciertos agentes químicos como el tiner los cuales tienen un efecto clastogénico en el ADN [3].

Es claro que la población está altamente expuesta a solventes orgánicos por vía dérmica y respiratoria, debido al poco o casi nulo uso de las medidas de protección como caretas, overoles, guantes y botas; además, al desconocer los efectos de mezclas como el tiner sobre la salud, estas son usadas para la limpieza de manos, brazos y cara del trabajador, aumentando la exposición y por lo tanto la frecuencia de daño cromosómico observado como micronúcleo.

Bonassi y colaboradores en el 2007 [7], mencionan que el incremento en la frecuencia de micronúcleos en una población es un predictor de riesgo de cáncer asociado al daño cromosómico, medido en linfocitos de sangre periférica como un indicador de ocurrencia temprana de procesos carcinogénicos en tejidos blanco. Es evidente que el grupo expuesto a solventes orgánicos está en mayor riesgo de sufrir enfermedades degenerativas como el cáncer respecto del grupo referente.

Los micronúcleos presentes en las personas no expuestas o referentes, pueden ser originados por daños en el ADN acumulados por constantes o prolongadas exposiciones de origen ambiental, teniendo en cuenta que el estilo de vida o hábitos alimenticios inadecuados, producen un incremento en las ROS que pueden interactuar con el ADN de las células, ocasionando un daño que será observable como micronúcleo.

No se observó, una interacción estadísticamente significativa entre la edad y la frecuencia de micronúcleos (1158.00, $p=0.526$), lo anterior es coherente con lo reportado en un estudio realizado en cooperación entre diferentes grupos de investigación de España y Portugal en el año 2007, en el cual no se encontró relación entre la frecuencia de micronúcleos y la edad [111], esto se explica en la teoría de los radicales libres y envejecimiento postulada en la década de los 90's [112], que menciona que el incremento de las ROS con la edad es seguido por el incremento de las defensas antioxidantes, disminuyendo así los índices de daño cromosómico en los organismos.

Los resultados sugieren que existe una correlación curvilínea de tipo cuadrática, estadísticamente significativa, entre la frecuencia de micronúcleos y el tiempo de exposición ($p=0.038$), sin embargo esta correlación no es muy fuerte, ya que la variabilidad observada en la frecuencia de micronúcleos sólo deja ver un 6.5% de la variabilidad observada en el tiempo de exposición ($R^2=0.065$, $p=0.038$), lo que indicaría en primera instancia que no existe relación directa entre la frecuencia de micronúcleos y el tiempo de exposición a solventes orgánicos.

El gen OGG1h ha sido ampliamente estudiado, permitiendo concluir que es un gen con gran relevancia biológica, fundamental en procesos de reparación del daño

oxidativo por causa de la exposición a agentes mutagénicos, o por el metabolismo celular normal; se sabe que el polimorfismo Ser326Cis exón 7 de éste gen, juega un papel importante en múltiples procesos de carcinogénesis y en el inicio de otras enfermedades degenerativas [113]. Esta investigación ha permitido identificar la exposición ocupacional a solventes orgánicos como la principal causa, del incremento en la frecuencia de micronúcleos del grupo expuesto, sin embargo y pese a la importancia biológica del polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h, no es posible observar una interacción estadísticamente significativa entre la frecuencia de micronúcleos, el genotipo ($p=0,403$) y/o fenotipo ($p=0.535$) de la población objeto de estudio. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa para la interacción entre la frecuencia de micronúcleos y el genotipo o fenotipo de la población expuesta. El efecto del polimorfismo del gen OGG1h sobre la frecuencia de MN es complejo, en este caso puede estar influenciado por polimorfismos de otras enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación del ADN.

Aunque la significancia funcional de estos polimorfismos genéticos, aún no es clara, se ha observado que los niveles bajos en la actividad del OGG1h, se encuentra alrededor del 40% de los pacientes con cáncer de pulmón [60]. Los estudios tampoco reportan asociación alguna entre la actividad genética de los polimorfismos Ser326Cis y la reparación del ADN en linfocitos humanos ($n=35$) [114]. Estas observaciones sugirieron que los polimorfismos con baja expresión fenotípica pueden modular la interacción de genotoxinas exógenas o endógenas en células blanco, afectando la frecuencia de daño inducido en el ADN en estas células y en última instancia riesgo de cáncer. Los alelos variables comunes determinan solamente cambios leves en la actividad catalítica de la proteína y por lo tanto, el aumento del posible riesgo de cáncer es bajo; sin embargo, la frecuencia del polimorfismo puede explicar un número importante de casos de cáncer en la población en general [108]. De igual manera, un estudio realizado en una población Checa, reportó un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de colon y cáncer colorectal (CRC), en aquellos individuos con variantes alélicas homocigotos en los polimorfismos del gen APE1 *Asn148Glu* y el polimorfismo del gen OGG1h *Ser326Cis*, indicando una fuerte interacción gen-gen, esta interacción entre genes involucrados en el mecanismo de reparación BER es probablemente debido a procesos inflamatorios y estrés oxidativo por el cáncer de colon [2, 107]. Podríamos decir entonces que cuando el efecto de un polimorfismo es ausente o no es muy fuerte, se requiere identificar y caracterizar otros genes de susceptibilidad para el riesgo a desarrollar cáncer para entender la interacción gen-gen [107].

Un estudio previo evaluó la asociación de los polimorfismos y el daño cromosómico como alteraciones cromosómicas y micronúcleos, mediante biomonitorio en linfocitos de sangre periférica o células exfoliadas; no obstante, se determinó que otros factores pueden interactuar en la frecuencia de micronúcleos como predictor temprano de cáncer, incluyendo otras exposiciones

ambientales a agentes carcinogénicos, dieta o consumo de micronutrientes, susceptibilidad individual, entre los cuales se encuentran los polimorfismos de otros genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos, y reparación del ADN [24].

Luego de una elevada exposición a agentes generadores de estrés oxidativo, la reparación del daño oxidativo puede inducir una fase de muerte celular programada (apoptosis), recientemente se encontró que los residuos OH8dG producto de la reparación de glicosilasa OGG1h sobre las guaninas oxidadas por alta exposición a las ROS, están implicados en la inducción de apoptosis [115], este mecanismo puede estar relacionado con los resultados obtenidos en el estudio, ya que no se observó diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia de micronúcleos y los genotipos Ser-Ser, Ser-Cis y Cis-Cis; de la población expuesta. Es probable que el daño en individuos con genotipo desfavorable sea tan alto que los productos de la reparación estén induciendo apoptosis antes que la célula entre en fase de división.

Es indudable que el grupo de trabajadores expuestos a solventes orgánicos presenta alto consumo de alcohol frente al grupo referente (11.494, $gl=2$, $p=0.003$); sin embargo, el consumo de alcohol como factor individual, no influye directamente en la frecuencia de Micronúcleos del grupo expuesto; sin embargo, al realizar el análisis de la influencia de la exposición conjugada con el consumo habitual de alcohol (1 o más veces x mes) se observa que existe interacción significativa sobre la frecuencia de MN del grupo en cuestión, esto se fundamenta en el hecho que el alcohol puede ser incluido en el grupo de los solventes orgánicos, por lo tanto actúa como potenciador, ya que este es el responsable de la acumulación de acetaldehído en personas expuestas a pinturas y tiner, esta mezcla se ha visto asociada con procesos de carcinogénesis [116]. El etanol al ser metabolizado en el hígado por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y el CYP 2E1, origina el acetaldehído (AA), siendo este un metabolito primario extremadamente tóxico, el cual interactúa rápidamente con proteínas y con el ADN; de esta manera el AA es un mutágeno potencial con características carcinógenas que pueden inhibir la reparación del ADN y conducir a metaplasias [117]. Además, los consumidores habituales de alcohol pueden estar expuestos a agentes carcinógenos o pro-carcinógenos que generalmente se injieren junto con las bebidas alcohólicas, tales como: nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fibras de asbesto; y aquellos presentes en la dieta ó en el lugar de trabajo [118]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la exposición ocupacional promueven la peroxidación de los lípidos y reaccionan con el material genético, lo que resulta en alteraciones en el ADN que pueden ser observables a través de MN. Además de estos efectos (carcinogénicos), el etanol y el acetaldehído pueden también incrementar la genotoxicidad por la generación de monómeros del cloruro de vinilo, inhibiendo la remoción de aductos del ADN [76].

En Valencia, Venezuela se realizó un estudio en una fábrica de zapatos, donde el 66.7% de los trabajadores presentaron un alto consumo de alcohol, identificándose la interferencia de este solvente en los procesos metabólicos de otros solventes orgánicos y específicamente del tolueno, por su contribución a las alteraciones de las pruebas hepáticas. Está demostrado que la ingesta de alcohol inhibe el metabolismo de degradación del tolueno y el xileno [76]. Lo anterior es coherente con este estudio debido a que los principales componentes del tiner (mezcla utilizada por la población expuesta) son el tolueno y el xileno.

Finalmente podemos decir que este estudio presenta gran relevancia biológica, científica y social, ya que se identificó la exposición ocupacional a solventes orgánicos como la principal causa del incremento en la frecuencia de micronúcleos como un predictor temprano de riesgo de cáncer y otras enfermedades en la población expuesta, además se identificó el consumo de alcohol como un factor determinante en este incremento. Conocer estos factores resulta de gran importancia prevenir en la población enfermedades como el cáncer, concientizando a los individuos por medio de charlas divulgaciones y publicaciones que permitan la reducción y/o eliminación de la exposición, generando así un camino primordial en el desarrollo de políticas de promoción de la salud y prevención de la enfermedad para estas poblaciones.

10 CONCLUSIONES

Para la genotipificación del gen OGG1h, se estandarizó la prueba de PCR con una temperatura óptima para el alineamiento de los cebadores o *primers* de 62°C, y con una cantidad ideal de *primers* de 0.5 µl por cada 25 µl de reacción y para la identificación del polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h se estandarizó la prueba de RFLPs con un tiempo ideal de 6 horas para la digestión de la enzima Sat I (Fnu4HI), lo cual permite identificar claramente los genotipos.

Se logró establecer las frecuencias genotípicas y fenotípicas del gen OGG1h, tanto en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos como en el grupo referente; obteniéndose los primeros resultados para una subpoblación del departamento del Cauca, aportando así datos esenciales para identificación de las frecuencias en la población Colombiana.

La frecuencia de micronúcleos encontrada para el grupo expuesto fue significativamente superior con respecto al grupo referente, lo cual indica que la exposición de origen ocupacional a solventes orgánicos, la poca cultura de protección y el uso indiscriminado de estos solventes son factores determinantes sobre el efecto genotóxico observado, lo que aumenta el riesgo a desarrollar cáncer y otras enfermedades degenerativas en la población expuesta.

La edad de los individuos no influye directamente sobre la frecuencia de micronúcleos en la población objeto de estudio, puesto que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia de MN y las diferentes edades de los individuos.

El incremento en la frecuencia de micronúcleos de las personas mas consumidoras de alcohol, en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos, nos permite concluir que existe interacción entre el consumo habitual de alcohol (1 o más veces x mes) la frecuencia de micronúcleos y el grupo.

No existe interacción entre el polimorfismo del gen de reparación 8-oxoguanina glicosilasa 1 en humanos (*ogg1h*) y el factor de exposición, con relación a la frecuencia de micronúcleos en las personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos, en el Departamento del Cauca

La realización de estudios que involucren a poblaciones en riesgo se hacen pertinentes, ya que tienen un gran impacto social y científico por su alto poder investigativo, al contener marcadores biológicos que permitan observar, conocer y analizar las relaciones entre factores genéticos y ambientales que pueden

enfocarse en la promoción de la salud y prevención de la enfermedad, cumpliéndose con el principal fin de la toxicología genética.

Se superan los objetivos planteados en la investigación, al identificar la interacción entre el consumo de alcohol, la exposición ocupacional a solventes orgánicos y la frecuencia de MN; esto permite generar nuevas hipótesis que ayuden a entender y conocer otros factores asociados al daño cromosómico.

11 PERSPECTIVAS

Plantear y ejecutar investigaciones que involucren otros biomarcadores para el análisis de daño cromosómico; como alteraciones cromosómicas, asociándolos con polimorfismos en otros genes de reparación del ADN y del metabolismo de xenobióticos en la misma población, de tal manera que los resultados obtenidos puedan ser asociados con esta investigación.

Desarrollar estudios con un tamaño de muestra mayor para aumentar el poder estadístico y determinar la influencia del genotipo del gen OGG1h sobre la frecuencia de micronúcleos y que además permitan corroborar o rechazar los resultados de este estudio.

Realizar nuevos estudios que permitan observar la interacción entre el polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h y los procesos de muerte celular programada ó apoptosis.

Evaluar *in vitro*, la genotóxicidad del tiner y la capacidad de reparación de las lesiones del ADN, en linfocitos de sangre periférica mediante el ensayo cometa, en individuos con las diferentes variantes alélicas del gen OGG1h.

Mejorar la protección de los individuos que hacen parte del sector laboral de pintura de carros y automóviles en general, ya que debe ser prioridad tanto para las Empresas promotoras de Salud (EPS), Administradoras del Régimen Subsidiado (ARS) y Administradoras de Riesgos Profesionales; como para todos y cada uno de los individuos que ponen en riesgo su salud y la de su familia, al no implementar debidamente las medidas de seguridad, incluyendo estudios que abarquen el interés científico y social.

Utilizar los resultados de este estudio como prueba científica de la gravedad de la exposición ocupacional a solventes orgánicos, en poblaciones vulnerables, de tal manera que el estado cuenta con una herramienta fundamental para la generación de políticas claras en el campo de la promoción de la salud y prevención de la enfermedad.

Desarrollar guías para la intervención social de la población expuesta ocupacionalmente, basándose en datos, evidencia clínica y científica de fuentes nacionales, al igual que generar políticas con aplicabilidad en todos los sectores socioeconómicos, y que permita incluir además del régimen contributivo el régimen subsidiado y la población vinculada.

12 IMPACTO

Se identificó la exposición ocupacional a solventes orgánicos como la principal causa, del incremento en la frecuencia de Micronúcleos y por lo tanto del incremento del riesgo a desarrollar cáncer y otras enfermedades en la población objeto de estudio.

Se logró establecer, la relación entre un importante sector laboral y la exposición a agentes genotóxicos (solventes orgánicos), utilizados para la dilución de pinturas para carros y automóviles en general, identificando posibles riesgos para la salud del trabajador.

Se desarrollaron charlas educativas en los talleres donde laboraban los trabajadores en la pintura de carros, informándoles sobre la importancia del uso adecuado de las medidas de protección, durante la realización de labores que involucren el manejo de sustancias potencialmente dañinas para la salud.

Se estableció la frecuencia genotípica y fenotípica del gen de reparación con gran relevancia biológica (8 Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h)), en una población del Cauca.

Con la estandarización de la PCR y los RFLP's para la identificación del polimorfismo Ser326Cis del gen OGG1h, se abre un nuevo camino, para investigaciones posteriores que sean desarrolladas por el Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, de la Universidad del Cauca.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stefano Bonassi, et al., *Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2001. **37**: p. 31-45.
2. Hannu Norppa, *Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms*. Toxicology Letters, 2004. **149**: p. 309-334.
3. John Whysner, et al., *Genotoxicity of benzene and its metabolites*. Mutation Research 2004. **566** p. 99-130.
4. Bensus Karahalil and Neslihan Ayün Kocabas, *hOGG1 SER326CYS genetic polymorphism in a Turkish population*. Arch Toxicol, 2005. **79**: p. 377-380.
5. Au W. William, *Heritable Susceptibility Factors for the Development of Cancer* Radiat. Res, 2006. **47**: p. B13-B17.
6. Au W. William, P. Navasumrit, and M. Ruchirawat, *Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic ADN repair genotypes* International Journal Of Hygiene and Enviromental Health, 2004. **207**: p. 301-313.
7. Stefano Bonassi, et al., *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans*. Carcinogenesis, 2007. **28**(3): p. 625-631.
8. L.Tomatis, *Environmental cancer risk factors. A review* Acta Oncol, 1988. **27** (5): p. 465-72.
9. *WORLD HEALTH ORGANIZATION (Organización Mundial de la Salud (OMS)) Biological monitoring of chemical exposure in the workplace* Geneva: World Health Organization, 1996.
10. NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), *Estimates of the fraction of cancer in the United States related to occupational factor*. 1981: p. citado por: HOYOS, L. S. Exposición Ocupacional, Biomarcadores de Riesgo de Cáncer en los Programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional para la Prevención. IV Congreso

internacional y VII Congreso Colombiano de Genética. Revista de la Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Vol. 38, no. 1, 2006; p. 29-39.

11. Leigh JP, et al., *Occupational injury and illness in the United States. Estimates of costs, morbidity, and mortality*. Arch Intern Med, 1997. **157**(14): p. 1557-1568.
12. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, *Informe de Enfermedad Profesional en Colombia 2003-2005*, D.d.R. Profesionales, Editor. 2007.
13. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, *IARC Monographs Programme finds cancer hazards associated with shiftwork, painting and firefighting*, P.R.N. 180, Editor. 2007.
14. Axelson O and Hodstedt C, *The health effects of solvents*. En: Zenz C, editor Occupational Medicine. San Luis: Editorial Mosby, 1994. **3ª edición**: p. 764-778.
15. Lynge, E., A. Anttila, and K. Hemminki, *Organic solvents and cancer*. Cancer Causes and Control 1997. **8**: p. 406-419.
16. Del Castillo Martín Nino, Mayor Ríos Jorge, and Almirall Hernández Pedro, *Efectos neurotóxicos por exposición a solventes orgánicos. Indicadores cognitivos*. Rev Cubana Salud Trabajo, 2003. **4**: p. 1-2.
17. Piscocoya, J.A., *Toxicidad de los solventes como riesgo ocupacional*. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna, 2000. **13** (1).
18. J. Pablo Radicella, et al., *Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci, 1997. **94**: p. 8010-8015.
19. Delclos, J., *Estudio de las condiciones de salud de los trabajadores potencialmente expuestos a hidrocarburos aromáticos*. En: Mendes R. Proyecto de salud ocupacional en la industria del petróleo (SOIP) Informe técnico final (Consolidado). OPS/OMS 1998.
20. Boiteux Serge, *In Oxidative Stress in Cancer*. AIDS and Neurodegenerative Diseases., 1998. **351-358**.
21. Tsukino H, et al., *hOGG1 Ser326Cys polymorphism, interaction with environmental exposures, and gastric cancer risk in Japanese populations*. Cancer Sci, 2004. **95** (12): p. 977-83.

22. Abul Elahi, et al., *The human OGG1 ADN repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk*. Carcinogénesis, 2002. **23**(7): p. 1229-1234.
23. Tatsuhiko Sakamoto, et al., *hOGG1 Ser326Cis Polymorphism and Risk of Hepatocellular Carcinoma among Japanese*. . Journal of Epidemiology, 2006. **16**: p. 233-239.
24. Jin-Won Hyun, et al., *8-Hydroxydeoxyguanosine Causes Death of Human Leukemia Cells Deficient in 8-Oxoguanine Glycosylase 1 Activity by Inducing Apoptosis*. Molecular Cancer Research, 2003. **1**: p. 290–299.
25. Kau HC, et al., *Genetic polymorphism of hOGG1 and risk of pterygium in Chinese*. Eye, 2004. **18** (6): p. 635-639.
26. Fenech Michael, *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*. Mutat Res 1993. **285**: p. 35-44.
27. Bonassi S., Neri S., and Puntoni R., *Validation of biomarkers as early predictors of disease*. Mutation Research, 2001. **480-481**: p. 349-358.
28. Michael Fenech, et al., *The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans*. Mutation Research 1999. **428**: p. 271–283.
29. Christine Till, et al., *Vision abnormalities in young children exposed prenatally to organic solvents*. NeuroToxicology, 2005. **26**: p. 599-613.
30. Niño R and Camargo J, *Caracterización del thinner para la industria de pinturas de uso doméstico en Santa Fe de Bogota D.C. Por cromatografía de gases*. Trabajo de grado (Química Farmacéutica): Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Farmacéutica, 1999: p. 70.
31. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY U.S (EPA), *National Scale Modeling of Air Toxics for the Mobile Source Air Toxics Rule; Technical Support Document*. EPA-454/ R-06-002 2006.
32. M Caraballo S and G Blanco G, *Evaluación Neuropsicológica De Trabajadores Expuestos A Solventes Orgánicos En Una Empresa De Transporte Público*, in *Revista de la Facultad de Medicina*. 2005.
33. Friedberg E.C, Walker G.C, and Siede W, *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, 1995: p. 14-19.

34. Fearon, E.R., *Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer*. Science, 1997. **278**: p. 1043 - 1050.
35. Gatti R. A, *The inherited basis of human radiosensitivity*. Acta Oncol, 2001. **40** (6): p. 702-711.
36. Miral Dizdaroglu, et al., *Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement*. Free Radical Biology & Medicine, 2002. **32** (11): p. 1102–1115.
37. Serge Boiteux and J.P. Radicella., *The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis*. Archives of Biochemistry and Biophysics 2000. **377**(1): p. 1–8.
38. Vilhelm A Bohr and Grigory L Dianov, *Oxidative ADN damage processing in nuclear and mitochondrial ADN* Biochimie 1999. **81**: p. 155-160.
39. Hoyos Luz Stella, *Exposición Ocupacional, Biomarcadores de Riesgo de Cáncer en los Programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional para la Prevención. IV Congreso internacional y VII Congreso Colombiano de Genética* Revista de la Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander 2006. **38** (1): p. 29-39
40. Grigory L. Dianov, et al., *Repair of abasic sites in DNA*. Mutation Research 2003 **531**: p. 157–163.
41. Markus Christmann, et al., *Mechanisms of human DNA repair: an update*. Toxicology 2003. **193**: p. 3–34.
42. Kenichi Nishioka, et al., *Expression and Differential Intracellular Localization of Two Major Forms of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase Encoded by Alternatively Spliced OGG1 mRNAs*. Molecular Biology of the Cell 1999. **10**: p. 1637-1652.
43. Kiyomitsu Arai, et al., *Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage*. Oncogene, 1997. **14**: p. 2857 - 2861.
44. Qiu-Mei Zhang and G.L. Dianov, *DNA repair fidelity of base excision repair pathways in human cell extracts*. DNA Repair, 2005. **4**: p. 263-270.
45. Andreia Dhénaut, Serge Boiteux, and J.P. Radicella., *Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle*. Mutation Research 2000 **461** p. 109–118.

46. David C., Boiteux S., and O`neill P, *Of excision of 8-oxo-guanine within ADN clustered damage by XRS5 nuclear extracts and purified human OGG1 protein*. *Biochemistry*, 2001. **40**: p. 11811-11818, citado por: LOMAX, M.E., CUNNIFE, S. and O`NEILL, P. 8-oxoG retards the activity of the ligase III/XRCC1 complex during the repair of a single-strand break, when present within a clustered ADN damage site. *ADN repair*. Vol. 3, 2004; p. 289-299.
47. Friedberg, E.R., *ADN damage and repair*. *Nature*, 2003. **421**: p. 436-440.
48. Keith W. Caldecott, *Mammalian single-strand break repair: Mechanisms and links with chromatin*. *DNA REPAIR*, 2007. **6** p. 443–453.
49. Piersen C.E. *et al*, *Evidence for an amino intermediate in the ADN polymerase beta deoxyribose phosphate excision reaction*. *Journal Biological Chemical*, 1996. **271** p. 17811-17815, citado por: Bearda, B. C. Base excision repair in nucleosomes lacking histone tails. *ADN Repair*. Vol. 4, 2005; p. 203-209.
50. Serge Boiteux and Marie Guillet, *Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 2004 **3**: p. 1–12.
51. Vidal Antonio, *et al.*, *Mechanism of stimulation of the ADN glycosilasa activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step*. Vol. 29, 2001; p.1290. *Nucleic Acids Research*, 2001. **6**: p. 1285-1292.
52. Lindahl T. and Anderson A., *Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid*. *Biochemistry* 1972. **11**: p. 3618-3623, citado por: BOITEUX, S., and GUILLET, M. Abasic sites in ADN: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *ADN repair*. Vol. 3, 2004; p. 1-12
53. Mark Stoneking, *Single nucleotide polymorphisms are the bread-and-butter of DNA sequence variation. They provide a rich source of information about the evolutionary history of human populations*. *Nature*, 2001. **409**: p. 821-822.
54. Arnold Oliphant, *et al.*, *BeadArray Technology: Enabling an Accurate, Cost-Effective Approach to High-Throughput Genotyping*. *BioTechniques*, 2002. **32**: p. S56-S61.

55. R. Mateuca, et al., *Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts*. Toxicology Letters, 2005. **156**: p. 277-288.
56. Anna Lladonosa, Dr. Pere Olivé, and Dra. Marta Carrera, *Unidad de genética molecular*. INSTITUTO I. UMBERT Unidad de genética molecular, 2008: p. 1-5.
57. Semple S, et al., *Impairment of colour vision in workers exposed to organic solvents*. Occup Environ Med, 2000. **57**: p. 582-587.
58. Weiss J.M., et al., *Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature*. Mol Carcinog, 2005. **42**(3): p. 127-41.
59. Tamar Paz-Elizur, et al., *DNA Repair Activity for Oxidative Damage and Risk of Lung Cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2003. **95**(17).
60. Kai Janssen, et al., *DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326*. Mutation Research 2001. **486**: p. 207-216.
61. Ellen L. Goode, Cornelia M. Ulrich, and John D. Potter, *Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2002. **11**: p. 1513-1530.
62. Ramirez Augusto, *Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia*. Anales Facultad de Medicina, 2006. **67**(1): p. 49-58.
63. Ellen K. Silbergeld and Devra Lee Davis, *Role of Biomarkers in Identifying and Understanding Environmentally Induced Disease*. Clinical Chemical, 1994. **40**(7): p. 1363-1367.
64. Fernando Gil Hernández, *The role of biomarkers in human toxicology*. Departamento de Medicina Legal y Toxicología, Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, 2001.
65. William W. Au, Salama A. Salama, and Carlos H. Sierra Torres, *Functional characterization of polymorphisms in ADN repair genes using cytogenetic challenge assays*. Environ. Health Persp, 2003. **111**: p. 1843-1850.
66. Hulka BS and Wilcosky T, *Biological markers in epidemiologic research*. Arch Environ Health, 1988. **43** (2): p. 83-9.

67. Frederica Perera, *Molecular epidemiology: A novel approach to the investigation of pollutant -related chronic disease*. New York: Praeger . 1986.
68. Albertini R.J and O'Neill J.P, *Human monitoring for somatic mutation in humans*. In Phillips, D.N., Venit, S. . Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1995: p. 341-366.
69. Sorsa M., Wilbourn J., and Vainio H., *Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk* 1992: p. Citado por: Vainio, H. et al. Use of biomarkers - new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. Toxicology Letters. Vol. 102-103, 1998; p. 581-589.
70. Carter S. B., *Effects of cytochalasins on mammalian cells*. Nature, 1967. **213**: p. 261-264.
71. Perera, F.G., *Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention*. . J. Natl. Cancer Inst., 1996. **88**: p. 5496-5509.
72. Harri Vainio, *Use of biomarkers new frontiers in occupational toxicology and epidemiology*. Toxicology Letters, 1998. **102-103**: p. 581-589.
73. Soderkvist, P. and O. Axelson, *On the use molecular biology data in occupational and environmental epidemiology*. Journal Occupational and Environmental Medicine, 1995. **37**(1).
74. *THE HISTORY OF PCR: Smithsonian Institution Archives*. Institutional History Division. Retrieved 24 June 2006. .
75. Eva Mas, et al., *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Revista AquaTIC 2001. **15** p. 1-10.
76. Rodríguez M., Squillante G., and Rojas Maritza, *Exposición ocupacional a solventes orgánicos en una fábrica de calzado en Valencia, Venezuela, 2001*. Gaceta Médica de Caracas, 2003. **111** (4).
77. Richard J. Albertini, D.A., George R. Douglas, Lars Hagmar, Kari Hemminki, Franco Merlo, A.T. Natarajan, Hannu Norppa, David E.G. Shuker, Raymond Tice, Michael D. Waters, Antero Aitio *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans* Mutation Research 2000. **463**: p. 111–172.

78. Stefano Bonassi, et al., *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(3): p. 625-631.
79. Hoyos Luz Stella, Cajas Nohelia, and Carvajal Silvio, *Manual de citogenética: linfocitos humanos*. 2002: p. 31-32.
80. Di Giorgio, M., et al., *Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos como biodosímetro de exposiciones in vivo agudas y crónicas*. Autoridad Regulatoria Nuclear Argentina, Hospital Italiano, Mevaterapia p. 229-236, Presentado en: "VI Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear". Lima, Perú, 9-13 noviembre, 2003.
81. Michael Fenech and Jimmy W. Crott, *Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay*. *Mutation Research* 2002 **504** p. 131–136.
82. Countryman, P.I. and J.A. Heddle, *The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes* *Mutat Res* 1976. **41**: p. 321-332.
83. Fenech M. and Morley A.A., *Measurement of micronuclei in lymphocytes*. *Mutat Res*, 1985. **147**: p. 29-36.
84. M. Zalacain, L. Sierrasesúmaga, and A. Patiño, *The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents*. *An. Sist. Sanit. Navar*, 2005. **28** (2): p. 227-236.
85. Michael Fenech, *The in vitro micronucleus technique*. *Mutation Research* 2000 **455** p. 81–95.
86. Fenech Michael, *Optimisation of Micronucleus Assays for Biological Dosimetry*. *Prog. Clin*, 1991.
87. Hannu Norppa and Ghita C.-M.Falck, *What do human micronuclei contain?* *Mutagenesis*, 2003. **18**(3): p. 221-233.
88. R. Mateuca, et al., *Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring*. *Biochimie* 2006. **88**: p. 1515-1531.
89. Zúñiga, G.M. and B.C. Gómez, *La prueba de micronúcleos*. *Revista de divulgación Científica y Tecnológica, Universidad Veracruzana*, 2006. **19** (1).

90. M. Fenech, et al., *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. Mutation Research 2003. **534** p. 65–75.
91. Frederik Jan Van Schooten, et al., *Effects of Oral Administration of N-Acetyl-L-cysteine: A Multi-Biomarker Study in Smokers*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2002. **11**: p. 167-175.
92. Wushou P Chang, et al., *Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate, g-radiation in residents of irradiated buildings*. The Lancet, 1997 **350**: p. 330-33.
93. Michael Fenech, et al., *Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, b-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia*. Carcinogenesis, 2005. **26** (5): p. 991--999.
94. Lars Hagmar, 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*. Cancer Research 1994. **54**(1): p. 2919-2922.
95. Stefano Bonassi, et al., *Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens*. Cancer Research, 2000. **60**: p. 1619-1625.
96. Pavel Rossner, et al., *Chromosomal Aberrations in Lymphocytes of Healthy Subjects and Risk of Cancer*. Environmental Health Perspectives, 2005. **113**(5).
97. Corey G., *Taller de Capacitación en Epidemiología Ambiental*. . ECO/OPS Metepec, 1990.
98. Forni, A., E. Pacifico, and A. Limonta, *Chromosome studies in workers exposed to benzene or toluene or both*. . Arch. Environ. Health. , 1971 **23** p. 85.
99. J. Angerer and A. Krämer., *Occupational chronic exposure to organic solvents XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene*. Int Arch Occup Environ Health, 1997. **69**: p. 91-96.
100. Mark M. Greenberg, *The Central Nervous System and Exposure to Toluene: A Risk Characterization*. Environmental Research, 1997. **72**: p. 1-7.

101. Bayram Yilmaz, et al., *Paint thinner exposure inhibits testosterone synthesis and secretion in a reversible manner in the rat*. Reproductive Toxicology, 2006. **22**: p. 791-796.
102. Peter Aka, et al., *Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations?* Mutation Research, 2004. **556**: p. 169-181.
103. Loïc Le Marchand, et al., *Association of the hOGG1 Ser326Cys Polymorphism with Lung Cancer Risk*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2002. **11**: p. 409-412.
104. Fabio Coppedè, et al., *Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Neuroscience Letters, 2007. **420**: p. 163-168.
105. Lode Godderis, et al., *Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation*. Toxicology 2006. **219**: p. 220-229.
106. Rafael Álvarez Cáseres, *Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS. Aplicación a las ciencias de la salud*. DIAZ DE SANTOS, 1995: p. 19-42.
107. G. Iarmarcovai, et al., *Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature*. Mutation Research, 2008. **658**: p. 215-233.
108. B. Pardini, et al., *DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic*. Mutation Research, 2008. **638**: p. 146-153.
109. Kvitko, K., *Biomarcadores de susceptibilidades e a relação com marcadores de exposição e efeito*. Departamento de Genética, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007. VII Congresso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental y Congreso Colombiano de Mutagénesis y Carcinogénesis. Universidad de los Andes.
110. Kau H. C, et al., *Genetic polymorphism of hOGG1 and risk of pterygium in Chinese*. Eye, 2004. **18** (6): p. 635-639.
111. A. Sánchez-Chardi, et al., *Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew Crocidura russula*. Environmental Pollution, 2008. **30**: p. 1–8.

112. Harman D., *Free radical theory of aging*. Mutation Research, 1992. **275** p. 257–266.
113. Tamar Paz-Elizur, et al., *DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: Potential application for cancer risk assessment and prevention*. Cancer Letters, 2008. **xxx**: p. xxx-xxx.
114. A. Zijno, et al., *Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects*. Mutation Research, 2006. **600**: p. 184-192.
115. Stickel, F., et al., *Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis*. Gut, 2002. **51**: p. 132-139.
116. Fang J.L. and Vaca C.E., *Development of a ³²P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'- monophosphate and DNA*. Carcinogenesis, 1995. **16** (9): p. 2177-2185.
117. Palmer T. N, *Alcoholism: a molecular perspective*. New York: Plenum Press, 1991: p. 297-301.
118. Keith W. Singletary, et al., *Ethanol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct removal and increases 8-oxo-deoxyguanosine formation in human mammary epithelial cells*. Cancer Letters 2004 **203** p. 139–144.

ANEXO A

ENCUESTA CORTA

INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1H) Y EL FACTOR DE EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

Código:

Fecha: _____

Lugar: _____

Encuestador _____

Información personal

Nombre completo													
Empresa		Dirección				Tel.							
Edad		Sexo	1. M		2. F		Estado civil	1. Soltero		2. Casado		Otro	

Información laboral

Grupo	1. Expuesto (pintor de carros)			Años		2. No Expuesto			Ocupación				
Nivel de Educación		Primaria		Secundaria		Técnico		Tecnológico		Universitario			
Fuma	1. Si		2. No	Maneja Asbestos		1. Si		2. No	Soldador	1. Si		2. No	

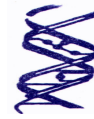
Información sobre estado de salud

¿Ha sido hospitalizado?	1. Si		2. No		¿Cuanto tiempo hace que lo hospitalizaron?								
¿Ha sido irradiado?	1. Si		2. No		¿Cuanto tiempo hace que lo irradiaron?								
Consume Medicamentos periódicamente			1. Si		2. No		¿Cual?						
En su familia hay personas con:		Retraso mental			Cáncer		Esterilidad		Otra				

ANEXO B

ENCUESTA LARGA

INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1H) Y EL FACTOR DE EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA



Codigo			
	dd	mm	aa
Fecha			
Lugar			

Encuestador: _____

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
1. Hepatitis			A B C
2. Meningitis			Viral Bacterial
Otras ¿Cuáles?			
Enfermedad	Si	No	Tipo
3. Herpes			Labial Genital
4. Cáncer			

¿Consumo 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			
	Parentesco	No	Si	# Casos
1. Malformaciones de Nacimiento	Papá			
	Mamá			
	Hermano (a)			
	Tío (a)			
	Sobrino (a)			
2. Retraso mental	Papá			
	Mamá			
	Hermano (a)			
	Tío (a)			
	Sobrino (a)			
3. Mongolismo o Síndrome de Down	Papá			
	Mamá			
	Hermano (a)			
	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:		
			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			

ANEXO C

CONSENTIMIENTO INFORMADO

MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS.

Yo _____, mayor de edad, he sido informado que el grupo de INVESTIGACION EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA de la Universidad del Cauca realizará el estudio establecer la “**INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1H) Y EL FACTOR DE EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**” en pintores de carros en la ciudad de Popayán y sus alrededores y se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO DEL ESTUDIO: Establecer la interacción entre el polimorfismo del gen de reparación 8-Oxoguanina Glicosilasa 1 en humanos (OGG1h) y el factor de exposición, con relación a la frecuencia de micronúcleos en personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos, en el Departamento del Cauca

YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO. En este estudio serán seleccionados 50 trabajadores expuestos a solventes orgánicos y 50 personas no expuestas como grupo referente, con el fin de diferenciar, al momento del análisis de los resultados, qué individuos son más susceptibles a la exposición ocupacional. El propósito de la investigación tiene relevancia social y científica, con una problemática de salud ocupacional. Participar en este estudio supone un mínimo riesgo contra mi salud. Sobre la competencia, formación integral y calidad de los investigadores es responsable la Universidad del Cauca. Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados, explicados de manera personal y confidencial al grupo objeto de estudio en forma anónima por parte de la profesora Luz Stella Hoyos directora del estudio. Los datos no serán utilizados con otra finalidad distinta al de ésta investigación.

REQUERIMIENTOS. Yo, en pleno uso de mis facultades mentales, libre y consciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que éste requiere de mi lo siguiente: contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos, para suministrar información personal referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar, si soy seleccionado para el estudio debo donar 10 ml de sangre, tomada de la vena del brazo de los cuales se tomarán 5 ml para ser procesada en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca mediante las pruebas in Vitro de Micronúcleos y 5 ml para aislar el ADN, de los cuales 40 µl serán empleados para la identificación de los polimorfismos genéticos y el ADN restante será criopreservado en el laboratorio de la Unidad de Toxicología Genética y Citogenética para futuros estudios.

RIESGO DE PARTICIPACION. Los riesgos potenciales de participación en el estudio son sangrado e infección en el sitio de la toma de muestra de sangre, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de muestras de sangre del brazo, y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y uso de jeringas y/o tubos y agujas estériles nuevas. Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se darán a conocer en forma grupal más no individual en un seminario, con el propósito de hacer una autorreflexión, luego de haber dicho una serie de conferencias. Tengo claro que no se me proveerá con ninguna compensación económica.

BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE: Atender a un curso de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por la exposición ocupacional a solventes orgánicos. Reflexión y motivación hacia al cambio de actitud para la prevención de riesgos a la salud por exposición ocupacional a los solventes orgánicos. Conocer los resultados grupales del estudio.

YO ENTIENDO QUE: Mi participación es completamente voluntaria y que puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo o puedo tomar libremente la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo.

Esta investigación fue evaluada y aprobada por el grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. La información recolectada será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de otros participantes para obtener resultados grupales. La Universidad del Cauca se compromete a vigilar que las muestras de sangre sean realizadas por un profesional experto y autorizado y en forma aséptica para evitar complicaciones.

Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante o después del estudio, a la profesora Luz Stella Hoyos de la Universidad del Cauca directora del estudio, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética en la carrera 2ª No. 1A -25 Barrio Caldas, Popayán, en los teléfonos 8209800 Ext. 2615.

La firma del documento del consentimiento informado es requerida para todas las personas participantes en un estudio como éste. Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje claro que yo he podido entender. Los riesgos y molestias que pueden presentarse me han sido explicados claramente.

Acepto que el material genético (ADN) aislado de los linfocitos sea congelado y conservado en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética y empleado en futuras investigaciones únicamente en la Universidad del Cauca para identificar polimorfismos e individuos que estén en mayor riesgo de desarrollar problemas debido a ciertas características de su ADN y exposición ocupacional. El ADN no será usado para ningún tipo de discriminación laboral, racial, política, social y económica.

También entiendo que como mi nombre no será vinculado con los resultados del estudio, los investigadores no estarán en la posibilidad de informar a ninguna otra persona sobre los resultados míos de las pruebas.

Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se de a conocer mi nombre.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico estudio **“INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1H) Y EL FACTOR DE EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA”**

Nombre del Participante

Firma del Participante

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Luz Stella Hoyos G.
Director del Proyecto.

ANEXO D

Condiciones de PCR y RFLP's y tabla de registro para la genotipificación del polimorfismo del gen OGG1h

INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN 8-OXOGUANINA GLICOSILASA 1 EN HUMANOS (OGG1h) Y EL FACTOR EXPOSICIÓN, CON RELACIÓN A LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS, EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS, EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.

Fecha: _____

Responsables: _____

Protocolo Polimorfismo Genético del gen OGG1: Ser326Cys - Exón 7

Numero de Muestras: _____ Master Mix No. No. Muestras + : _____

	Normal (50 µl)	Normal (25µl)	Master Mix 1
H ₂ O	28.3µl	14.15µl	µl
DNTPs 0.1mM	2.5µl	1.25µl	µl
Buffer 5X green	10µl	5µl	µl
MgCl₂ Marca: Promega Concentración: 2mM Vortex bien disuelto	4µl	2µl	µl
Primer F OGG1 0.5 µM	1µl	0.5µl	µl
Primer R OGG1 0.5 µM	1µl	0.5µl	µl
Taq 0.02 U/µl Promega	0.2µl	0.1µl	µl
ADN (65°C x 15') 100ng	3 µl	1.5µl	µl
Volumen total	50µl	25 µl	µl

Volumen total ÷ Numero de muestras = µl

ELECTROFORESIS PCR

Gel N°1: 1.5% Agarosa: Nusive Tiempo: 30min-80V

Poso	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Muestra												
Resultado												
Amplificación ADN												

RESULTADOS RFLPs

Gel N° 2: 3% Agarosa: Metaphor Tiempo: 20min-40V / 40min-80V

Poso	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Muestra												
Silvestre (213)												
Mutante Hete (213, 164, 49)												
Mutante Homo (164,49)												

Gen OGG1 Ser326Cys CONDICIONES DE PCR			
	T° °C	Tiempo (min.)	
Inicio	94°	4	1 ciclo
Desnaturalización del ADN	94°	30 s	Ciclos: 35
Alineación de primers	62°	30s	
Extensión o Polimeración	72°	90 s	
Extensión final	72°	5	1 ciclo
	4°C	∞	
Entró		Salió	

CONDICIONES DE RFLP Empleando Sat I (Fnu 4 HI)			
Numero de Muestras: _____	Master Mix No. Muestras + : _____		
	1 Tubo	Varios tubos	
H ₂ O desionizada	12µl	µl	
Buffer 10X G	2µl	µl	
Enzima Sat I (Fnu 4HI)	1µl	µl	
ADN amplificado (PCR)	10µl	µl	
Volumen total	25µl	µl	Adición a cada tubo
Volumen total ÷ Número de muestras = µl			
Temperatura: 37°C		Tiempo: 6 horas	
Entró		Salió	

