

**EFFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL
METABOLISMO (GSTT1 Y GSTM1) EN LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES
CROMOSOMICAS (*IN VITRO*) POR EL TINER EN LINFOCITOS HUMANOS**

**YOLY DAYANA MORENO ORTEGA
CATHERIN YURANY GONZÁLEZ R.**

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

**EFFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL
METABOLISMO (GSTT1 Y GSTM1) EN LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES
CROMOSÓMICAS (*IN VITRO*) POR EL TINER EN LINFOCITOS HUMANOS**

**YOLY DAYANA MORENO ORTEGA
CATHERIN YURANY GONZÁLEZ R.**

Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo

**Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo
DIRECTORA**

**Mg. Silvio M. Carvajal
ASESOR**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNÉTICA
POPAYÁN
2008**

Nota de aceptación:

Firma del director
Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo

Firma del jurado
Msc. Claudia Patricia Acosta

Firma del jurado
Ph.D. Nohelia cajas Salazar

Fecha de sustentación: Popayán, 24 de noviembre de 2008

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, haberme dado salud para lograr mis objetivos y brindarme la oportunidad de celebrar en compañía de mi familia, además de su infinita bondad y amor.

Con mucho cariño a mis padres Yslanda Ortega Berdugo y Juan B. Moreno Arteaga por su apoyo incondicional y por acompañarme en todos los momentos de mi vida. A mi madre Por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mi padre por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, dándome el valor para salir adelante.

A mis hermanos María Camila y Juan Leonardo Moreno quienes son el motor para plantear y lograr todos mis objetivos.

A mi abuelo Federico Ortega que aun estando en el cielo siempre he sentido su compañía y apoyo.

A mi novio Jonatan Valencia, por su amor incondicional y estar a mi lado brindándome su apoyo y colaboración en los momentos difíciles y para alcanzar esta meta.

A mi directora de tesis Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo por brindarnos todo sus conocimientos y por la confianza brindada durante todo este proceso.

A los integrantes del grupo de laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por su colaboración y amistad.

A mis amigos y familiares que creyeron en mí y me apoyaron para realizar este sueño.

Dayana Moreno Ortega

AGRADECIMIENTOS

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

A nuestros padres por su dedicación y apoyo.

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

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

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

A Jonatan Valencia, por su apoyo, motivación y contribución en el desarrollo de este proyecto.

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

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

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	
INTRODUCCION	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. ANTECEDENTES	25
3.1 ESTUDIOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS PRESENTES EN EL TÍNER	25
3.2 EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO GSTT1 Y GSTM1 SOBRE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y RIESGO DE CÁNCER.	26
3.3 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	27
3.3.1 Respuesta in vitro a la exposición de los componentes del tiner asociados con los polimorfismos en las enzimas metabólicas	27
3.3.2 Prueba de alteraciones cromosómicas (ACs) como biomarcador	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. OBJETIVO GENERAL	29
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5. MARCO TEÓRICO	30
5.1. SOLVENTES ORGÁNICOS	30
5.2. TÍNER	30

5.3. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS (BIOTRANSFORMACIÓN)	31
5.3.1. Enzimas de la fase I.	32
5.3.2. Enzimas de la fase II.	33
5.4. POLIMORFISMO Y SUSCEPTIBILIDAD GENETICA	33
5.4.1. Polimorfismo del gen GSTT1.	34
5.4.2. Polimorfismo del gen GSTM1.	35
5.5 BIOMARCADORES	36
5.6. EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	37
5.5. CITOTÓXICIDAD	37
5.5.1. Índice mitótico (I.M).	37
5.7. LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	37
5.8. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs)	38
5.8.1. Significancia biológica.	38
6. METODOLOGÍA	40
6.1. QUÍMICOS	40
6.2. TIPO DE ESTUDIO	40
6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	41
6.3.1. Prueba citotóxica.	41
6.3.2. Prueba Genotóxica.	44
6.4. SELECCIÓN DE DONANTES	44

6.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS GENES DE LA GLUTATION-S-TRANSFERASA GSTT1 Y GSTM1	45
6.5.1. Aislamiento y extracción de linfocitos humanos de sangre total.	45
6.5.2. Polimorfismo genético.	46
6.5.3. Análisis de los polimorfismos genéticos.	46
6.6. PRUEBAS BIOLÓGICAS	47
6.6.1. Establecimiento de los cultivos.	47
6.6.2. Cosecha celular.	47
7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
7.1. PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	48
7.3. PRUEBA DE GENOTOXICIDAD	49
8. RESULTADOS	50
8.1 ENSAYOS PRELIMINARES	50
8.2. EFECTO CITOTÓXICO DEL TÍNÉR	50
8.3. EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNÉR	54
8.4. ASOCIACION EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNÉR EN LINFOCITOS HUMANOS (<i>IN VITRO</i>) Y EL EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO GSTT1 Y GSTM1	57
8.5. EFECTO COMBINADO DE LOS GENES GSTT1 Y GSTM1.	60
9. DISCUSIÓN	63
9.1. EFECTO CITOTÓXICO DEL TÍNÉR	64

9.2. EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNER	66
9.3. ASOCIACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNER EN LINFOCITOS HUMANOS (<i>IN VITRO</i>) Y EL EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO GSTT1 Y GSTM1	68
9.3.1. Asociación del efecto genotóxico y los polimorfismos del gen GSTT1.	68
9.3.2. Asociación del efecto genotóxico y los polimorfismos del gen GSTM1.	69
9.3.3. Efecto combinado de los genes GSTT1 y GSTM1.	71
10.CONCLUSIONES	74
10. IMPACTO	75
11. SUGERENCIAS	76
BIBLIOGRAFIA	77

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Componentes del Tíner, analizadas por cromatografía de gases mediante la prueba del piano.	31
Tabla 2. genotipos encontrados en la población no expuesta a solventes orgánicos.	45
Tabla 3. Índice mitótico de linfocitos humanos de sangre periférica total tratados <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones de tíner durante 24 horas.	51
Tabla 4. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales (ACs totales) de linfocitos humanos de sangre periférica tratados <i>in vitro</i> durante 24 horas con tíner.	55
Tabla 5. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales (ACs/100células) de linfocitos humanos de sangre periférica tratados <i>in vitro</i> con tíner, con relación a los genotipos de GSTT1.	57
Tabla 6. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales (ACs/100células) de linfocitos humanos de sangre periférica tratados <i>in vitro</i> con tíner, con relación a los genotipos de GSTM1.	59
Tabla 7. Efecto de la combinación de los genotipos GSTT1 y GSTM1 en la frecuencia de alteraciones cromosómicas totales inducida por el tratamiento con tíner en linfocitos humanos de sangre periférica.	61

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Descripción de variables	41
Cuadro 2. Diseño experimental <i>in vitro</i> . Prueba citotóxica para el registro de índice mitótico (I.M%).	42
Cuadro 3. Diseño experimental <i>in vitro</i> . Prueba genotóxica para el registro de alteraciones cromosómicas (ACs) y los polimorfismos de los genes GSTT1 y GSTM1.	43

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Biotransformación de xenobióticos	32
Figura 2. Frecuencia del genotipo GSTT1nulo en el mundo.	34
Figura 3. Susceptibilidad al medio ambiente	36
Figura 4. Ejemplos de alteraciones cromosómicas estructurales.	39
Figura 5. Protocolo de la prueba de índice mitótico (IM).	41
Figura 6. Protocolo de la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs).	44
Figura 7. Patrón de bandas de los productos de la amplificación de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1 por PCR multiplex.	46
Figura 8. Asociación lineal negativa entre el IM de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i> y las diferentes concentraciones de tiner durante 24 horas.	52
Figura 9. Metafases (Met) observadas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de tiner.	53
Figura 10. Alteraciones cromosómicas (ACs) encontradas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos observadas con los diferentes tratamientos de tiner.	55
Figura 11. Asociación lineal positiva entre la frecuencia de ACs/100células inducidas <i>in vitro</i> en linfocitos humanos de sangre periférica y las concentraciones de tiner.	56
Figura 12. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con tiner, en función del genotipo GSTT1 (positivo y nulo).	58

Figura 13. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con tiner, en función del genotipo GSTM1 (positivo y nulo).

53

Figura 14. Efecto de la combinación de los genotipos GSTT1 y GSTM1 en la frecuencia de alteraciones cromosómicas totales inducida por el tratamiento con tiner en linfocitos humanos de sangre periférica.

62

RESUMEN

Los solventes orgánicos son compuestos que poseen muchas propiedades útiles al hombre para diversas actividades, sin embargo este tipo de químicos representan además un potencial riesgo en la salud, se ha demostrado que la exposición a estas sustancias ya sea en concentraciones bajas son causantes de problemas en el sistema nervioso y En los últimos años, se ha incrementado la atención a problemas de la exposición a agentes potencialmente tóxicos como el tiner en el lugar de trabajo. En un numero amplio de estudios epidemiológicos establecen que el riesgo de cáncer se potencializa con los procesamientos de pinturas. Los estudios epidemiológicos tradicionales para la evaluación de carcinógenos y mutágenos relacionados con el riesgo de cáncer por exposición, han presentado dificultades, durante décadas. Muchos de los trabajos en la actualidad, se enfocan en encontrar pruebas sensibles a la exposición ambiental con el fin de tomar medidas y prevenir consecuencias indeseables. Marcadores citogenéticos como las ACs han sido considerados como un biomarcador pertinente en la identificación de los primeros efectos biológicos de exposición a carcinógenos y de personas en riesgo de desarrollar cáncer. La respuesta biología del hombre a los diversos agentes que se encuentran en el ambiente depende de la susceptibilidad individual y directamente de los factores genéticos como es el caso de los polimorfismos de los genes que codifican las enzimas del metabolismo de xenobióticos, dentro de las cuales encontramos un complejo enzimático que juega un papel fundamental en la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos, facilitando la excreción de estas sustancias del organismo, la Glutathion S-Tranferasa (GSTs) participan en la fase II del metabolismo. Los genes polimórficos GSTT1 y GSTM1 están asociados con una diferencia significativa en el metabolismo de estos agentes. Estas variaciones de susceptibilidad identificadas por los polimorfismos son consideradas como un factor potencial de riesgo al cáncer. En el presente estudio evaluamos el efecto modulador del polimorfismo de los genes del metabolismo (GSTT1 y GSTM1) en la inducción de alteraciones cromosómicas *in vitro* por el tiner en linfocitos humanos de sangre periférica. Los linfocitos son obtenidos por 20 donadores saludables, no fumadores de género masculino y que no se encuentran expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos, y se determinan los genotipos GSTT1 y GSTM1. Los cultivos

de linfocitos tratados con las diferentes concentraciones de tiner, presentan un incremento significativo en la frecuencia de ACs ($P < 0.001$). Los individuos con el genotipo GSTT1 nulo muestra un incremento significativo en la frecuencia de ACs para todos los tratamientos, respecto a los individuos con el genotipo presente ($P < 0.0001$). El efecto del genotipo GSTM1 nulo es significativo, pero su efecto es más relevante en los linfocitos expuestos a la concentración alta. Este resultado muestra claramente que el genotipo GSTT1 nulo es un factor de riesgo frente a la exposición de los solventes orgánicos a diversas concentraciones. Para el efecto combinatorio de los genotipos se logro establecer que los individuos con GSTT1 nulo y GSTM1 nulo mostro un incremento significativo ($P < 0.0001$) con una frecuencia de ACs a comparación de los individuos que tiene presentes ambos gen. Estos resultados sugieren que los genes GSTT1 y GSTM1 están involucrados en el metabolismo del tiner.

INTRODUCCIÓN

El tiner es uno de los solventes orgánicos más empleados en la industria, especialmente por los trabajadores informales, debido a su fácil adquisición y bajo precio. Es una sustancia altamente potencializada, ya que está conformada por una mezcla de solventes, en la que se encuentran químicos tales como: benceno, tolueno, xileno, entre otros [1]. La no implementación o el uso inadecuado de equipos de bioseguridad por quienes manipulan estas sustancias, ayuda a que estos químicos se incorporen y se distribuyan en el organismo con gran facilidad. Para la eliminación de estos químicos el organismo tiene un mecanismo de biotransformación, el cual, consiste básicamente en dos fases. En la fase I se encuentran las enzimas del Citócromo P450 (CYP450), quienes convierten los xenobióticos en compuestos electrofílicos más hidrosolubles, siendo altamente reactivos con el ADN y otras moléculas celulares; estos compuestos electrofílicos son detoxificados por las enzimas de la fase II del metabolismo Glutathion S-Transferasa (GST) de la fase II del metabolismo [2].

Las enzimas que intervienen en el proceso de biotransformación de xenobióticos, forman parte importante de mecanismos encargados de modificar el riesgo de adquirir alguna enfermedad [3]. Este efecto modulador depende de la variabilidad genética de cada individuo, la cual, se encarga de controlar los diferentes mecanismos presentes en el organismo (ciclo celular, diferenciación celular, sistemas de reparación), obteniendo como resultado la probabilidad de potencializar o minimizar el riesgo de desarrollar cáncer [4]. Esta susceptibilidad y respuesta está asociada, algunas veces, con la capacidad individual para metabolizar tóxicos. El polimorfismo presente en estos genes, pueden afectar el nivel de expresión, estructura o actividad catalítica de las enzimas metabolizadoras, influenciando de esta manera, la susceptibilidad ante algunos xenobióticos [5].

Numerosos estudios realizados, sugieren que los polimorfismos presentes en los genes que codifican para enzimas metabolizadoras de xenobióticos, están asociados con un incremento en la incidencia de cáncer, por lo que son utilizados como biomarcadores de susceptibilidad [6]. Para evaluar el efecto de la variabilidad inter-individual se ha implementado el uso de biomarcadores citogenéticos con el fin de identificar la interacción gen-ambiente. Por lo que es importante resaltar la prueba de alteraciones cromosómicas como biomarcador de

efecto, ya que permite medir parámetros indicativos de cambios biológicos como respuestas a sustancias químicas [7].

En este estudio se emplearon linfocitos humanos de sangre periférica, con polimorfismos en los genes GSTT1 y GSTM1, que codifican para las enzimas del metabolismo de xenobióticos, con el fin de determinar el efecto modulador del polimorfismo de estos genes en la inducción de alteraciones cromosómicas (ACs) *in vitro* con el tiner. Se hizo pertinente el desarrollo de este estudio, debido a la necesidad de identificar grupos humanos en riesgo y potencialmente susceptibles a enfermedades por la exposición ocupacional y/o ambiental a una serie de mezclas complejas y sustancias tóxicas. Por lo que se evaluó el efecto genotóxico del tiner en linfocitos humanos (*in vitro*) y la modulación por el polimorfismo de los genes del metabolismo Glutathion S-Transferasa T1 (GSTT1) y Glutathion S-Transferasa M1 (GSTM1).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el medio ambiente y en el lugar de trabajo existe un gran número de agentes tóxicos (biológicos, físicos y químicos) a los que diariamente las personas se encuentran expuestas. Un grupo importante de estos tóxicos son los solventes orgánicos, como: hidrocarburos, cetonas, aldehídos, alcoholes, ésteres, éteres y moléculas aromáticas pequeñas, las cuales se evaporan y se incorporan rápidamente al aire como compuestos orgánicos volátiles [8]. Las razones de la toxicidad de estas sustancias y la diversidad de efectos adversos sobre el organismo, tienen su explicación por su afinidad y acumulación en los tejidos ricos en grasa, como el sistema nervioso central (SNC), el sistema nervioso periférico (retina, vías visuales, nervio óptico) y sus propiedades físico-químicas que facilitan su absorción [13]. Por otra parte, cabe resaltar que la población que manipula este tipo de sustancias, no emplea ninguna clase de equipo de bioseguridad, y que no existe una capacitación adecuada acerca del uso de estos compuestos químicos además de no encontrarse afiliados a ninguna entidad prestadora de salud (E.P.S.).

Los solventes orgánicos (tolueno, xileno, benceno, entre otros) son utilizados ampliamente en diversos procesos industriales. Según estudios realizados en Italia, se considera que entre el 10 y el 16% de los trabajadores se encuentran expuestos a este tipo de sustancias [9]. En Estados Unidos, se calcula que cerca de cien mil trabajadores tienen algún tipo de exposición al tolueno y, aproximadamente, 140.000 al xileno, mientras que en Suecia, se llega a afirmar que entre el 3 y el 4% de la población general se encuentra expuesta [10]; a nivel mundial el interés en la exposición a los hidrocarburos aromáticos se ha centralizado entorno al benceno, porque es considerado como carcinógeno humano [11], y se ha demostrado que causa problemas de salud, aun en concentraciones bajas [12].

En Colombia, la exposición ocupacional a los solventes orgánicos es un tema que no ha recibido la importancia que se merece, como se puede deducir de los pocos estudios epidemiológicos de exposición ocupacional, donde se demuestra un uso inadecuado e infrecuente de los elementos de protección personal además de encontrar niveles elevados de metabolitos de solventes orgánicos en muestras de orina en trabajadores de fabricas de pinturas y pegantes en Bogotá [178]. Además otro estudio realizado por el Instituto de Seguros Sociales de Colombia en cooperación con el centro de neurociencias de Cuba, detectó alteraciones

funcionales del Sistema Nervioso Central en trabajadores potencialmente expuestos en industrias del Valle del Cauca [179]. Demostrando así, que no existen estudios *in vitro* que evalúen el efecto genotóxico de mezclas complejas de solventes orgánicos o los efectos en personas expuestas ambiental u ocupacionalmente.

Uno de los solventes orgánicos más empleados en el país y particularmente en el municipio de Popayán (Cauca) por el comercio informal (pintores, ebanistas, mecánicos, soldadores, etc.), es el tiner, que está conformado por una mezcla compleja de solventes orgánicos y tiene como componentes principales el benceno, tolueno y xileno. En la actualidad se han realizado estudios solamente de sus componentes por separado, demostrando que estos y sus metabolitos causan daño en el material genético, produciendo alteraciones cromosómicas (ACs), micronúcleos (MNs) e intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) [180, 181, 182], lo que no ha permitido determinar el efecto potencializador aditivo y/o sinérgico de mezclas complejas de solventes orgánicos como el tiner [183]. También se ha relacionado el desarrollo de enfermedades degenerativas y diversos tipos de cáncer como el de hígado, vejiga, pulmón y esófago, con la exposición crónica a solventes orgánicos [184, 185, 186, 187, 188].

Por otra parte se ha encontrado una asociación directa entre las ACs en linfocitos humanos de sangre periférica y el riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer [66]. Los individuos susceptibles a diversos carcinógenos y mutágenos ambientales podrían presentar respuestas genotóxicas mayores a las exposiciones que inducen una pequeña o ninguna respuesta en individuos no susceptibles. Actualmente se pueden identificar efectos adversos en la salud humana por exposición con respecto a la variabilidad individual [16,17], con ayuda de la experimentación *in vitro* y la implementación de biomarcadores citogenéticos de efecto como alteraciones cromosómicas (AC) y biomarcadores de susceptibilidad como los genes que participan en el metabolismo de xenobióticos [15,18].

Por lo anterior, fue pertinente determinar el efecto genotóxico *in vitro* del tiner en linfocitos humanos de sangre periférica para de esta forma identificar la posible interacción entre los componentes activos del tiner con el DNA y también la posible asociación entre polimorfismos en los genes GSTT1 y GSTM1 y el daño genotóxico causado por el tratamiento con tiner. Debido a que en el departamento del Cauca la exposición ocupacional a solventes orgánicos, siendo en tiner el de mayor uso, presenta una asociación directa con el incremento de ACs [78] y que además una investigación reciente empleando el ensayo cometa, establece al

tíner como inductor de daño genético en linfocitos humanos tratados *in vitro* [72], resulta significativo evaluar los siguientes interrogantes: ¿Qué efecto citotóxico tiene el tíner en los linfocitos humanos?, ¿Tiene el tíner efecto genotóxico en los linfocitos humanos tratados *in vitro*? y ¿Cuál es el efecto modulador del polimorfismo en las enzimas del metabolismo GSTT1 y GSTM1 en la inducción de alteraciones cromosómicas (*in vitro*) en los linfocitos humanos por el tíner?

Con base en los interrogantes anteriores, se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

1. Si el tratamiento con tíner en cultivos *in vitro*, de los linfocitos humanos de sangre periférica total tiene efecto citotóxico, se espera que: el índice mitótico difiera del registrado en los linfocitos tratados con el solvente puro, Dimetil Sulfóxido (DMSO) (**Hi**), o que el índice mitótico sea igual al registrado con el solvente puro (**Ho**).
2. Si el tratamiento con tíner en cultivos *in vitro*, de los linfocitos humanos de sangre periférica total tiene efecto genotóxico, se espera que: La frecuencia de alteraciones cromosómicas difiera de la registrada en los linfocitos tratados con el solvente puro, DMSO (**Hi**), o que La frecuencia de alteraciones cromosómicas sea igual al registrado con el solvente puro (**Ho**).
3. Si los polimorfismos de las enzimas metabólicas (GSTT1 y GSTM1) expresados en la sangre periférica humana tienen efecto modulador; se espera que: haya una interacción estadísticamente significativa entre el efecto inductor de alteraciones cromosómicas (AC) por tíner y los genotipos individuales o combinados de los genes (**Hi**), o de lo contrario no será significativa estadísticamente, y el efecto inductor de AC por tíner será independiente de los genes individuales o combinados (**Ho**).

2. JUSTIFICACIÓN

Los solventes orgánicos son utilizados ampliamente tanto en industrias como en el comercio informal (pintores, ebanistas, mecánicos, soldadores, etc.), en especial las mezclas complejas como el tiner, que está conformado por una serie de solventes (benceno, tolueno, xileno entre otros), los cuales se evaporan, incorporan y acumulan rápidamente a la atmósfera, siendo más fácil el acceso al organismo por vías de absorción ya sea dérmica o por inhalación, teniendo como consecuencia una exposición directa a estos agentes, aumentando así los riesgos de producir alguna alteración en la salud de los individuos [19]. La exposición a solventes orgánicos, es considerada un riesgo ocupacional que confrontan millones de trabajadores en todo el mundo. Esta problemática a escala mundial, se ha centralizado en torno al benceno y a sus derivados como el tolueno y el xileno, los cuales se consideran tóxicos inclusive a concentraciones bajas, dejando de lado los efectos de las diferentes mezclas de solventes que son utilizados frecuentemente por los trabajadores.

Diversos estudios de biomonitorio genético han encontrado una asociación entre la exposición ocupacional a solventes orgánicos y el daño citogenético, evidenciando un incremento significativo en la frecuencia de ACs, ICHs y MNs [189, 190, 191], así como una elevada incidencia de diversos tipos de cáncer, como el de pulmón, riñón, esófago, vejiga y próstata además de linfomas y leucemias en personas expuestas constantemente a los solventes orgánicos [180, 187, 192, 193, 194, 195]. Otros estudios han reportado el efecto genotóxico de los solventes orgánicos, como el realizado en trabajadores de fabricas de zapatos, donde personas expuestas a estos químicos, mostraron un incremento en la frecuencia de MNs en linfocitos de sangre periférica [178]; y el estudio realizado en la ciudad de Popayán con pintores de carros, evidenciando un aumento en la frecuencia de ACs en linfocitos de personas expuestas con respecto al grupo referente [81]. En estos dos estudios se plantea la hipótesis de una inducción de daño genotóxico por exposición a solventes orgánicos, y que el incremento del daño puede deberse a la presencia de benceno y otros solventes frecuentemente empleados en las actividades laborales.

Los solventes orgánicos pueden actuar como reguladores de la expresión de algunos genes, aumentando o disminuyendo la síntesis o actividad de algunas proteínas o modificando la velocidad de las actividades metabólicas [196]. El contacto prolongado con estos compuestos químicos, puede provocar diversas e

irreversibles mutaciones en el material genético de estos individuos, las cuales se verán reflejadas en alteraciones del metabolismo del organismo, produciendo graves repercusiones clínicas, efectos mutagénicos y carcinogénicos. Esto permite proporcionar nuevas hipótesis y conceptos sobre el efecto de los solventes sobre el DNA, lo cual se puede confirmar o rechazar mediante la experimentación *in vitro*, permitiendo así, establecer importantes conexiones entre la epidemiología humana y la toxicología experimental [79].

Con los avances en la biología molecular y la genética, el papel de la exposición ambiental y ocupacional ha sido correlacionado con las diferencias polimórficas en los genes del metabolismo entre otros, debido a la diferencia existente entre las poblaciones del mundo en cuanto a la respuesta que pueden tener ante un mismo factor ambiental [26]. El grado de susceptibilidad y la respuesta biológica entre los individuos y poblaciones a los efectos genotóxicos y carcinogénicos de agentes químicos como los solventes orgánicos (tíner), es diferente, y está determinada por factores genéticos como los polimorfismos de los genes que codifican las diferentes enzimas del metabolismo de xenobióticos como la Glutación S-Transferasa T1 y M1 (genes de detoxificación), actividad enzimática expresada en cultivos de sangre total [21-22,6]. Estas variaciones de susceptibilidad identificadas por los polimorfismos son consideradas como un factor potencial de riesgo al cáncer [23]. Además, es importante resaltar, que uno de los principales objetivos en los proyectos Genoma Humano y Genoma Ambiental, es establecer la interacción existente entre gen-ambiente, ya que esta puede estar implicada en el incremento de riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer; basándose en el descubrimiento y el análisis funcional de los polimorfismos del DNA, y el desarrollo de estudios epidemiológicos, con el fin de implementar nuevas estrategias de prevención e intervención terapéutica. [24].

Para la identificación de la interacción gen-ambiente, se ha implementado el uso de biomarcadores citogenéticos como la prueba de alteraciones cromosómicas (inducida *in vitro*), que identifica alteraciones de tipo estructural y numérica causada por agentes genotóxicos (físicos, químicos o biológicos), que están asociadas con problemas de salud como el envejecimiento, retardo mental, anomalías morfológicas en humanos y de acuerdo con una serie de estudios, se ha determinado que esta prueba es una herramienta de gran importancia en la predicción de riesgo de cáncer [25]. La prueba presenta una gran relevancia en la determinación de la respuesta a diversos grados de exposición, para luego relacionar alteraciones cromosómicas con mutagenicidad y carcinogenicidad [26].

Los linfocitos humanos son células valiosas para realizar estudios de experimentación *in vitro*; se obtienen fácilmente, mediante métodos poco invasivos para los individuos donadores. Estudios realizados en este tipo de células de individuos expuestos, han mostrado daños en sus cromosomas dando un pronóstico anticipado de posible riesgo de desarrollar cáncer [27]. El uso de los linfocitos *in vitro* como sistema de evaluación de tóxicos ambientales, permite identificar compuestos con capacidad citotóxica o genotóxica y al mismo tiempo evaluar los efectos adversos de compuestos tóxicos ya conocidos para estudiar los mecanismos de acción [28], además, de permitir el control de las variables físico-químicas presentes en todo proceso biológico para el desarrollo óptimo del experimento.

Por todo lo sustentado anteriormente se hace necesario y pertinente realizar el presente estudio para evaluar el efecto genotóxico del tiner y su capacidad de inducción de alteraciones cromosómicas (ACs) *in vitro* en los linfocitos humanos de personas saludables no expuestas a agentes químicos, moduladas por la presencia de polimorfismos en los genes del metabolismo GSTT1 y GSTM1, ya que estos codifican enzimas encargadas de la detoxificación de sustancias potencialmente carcinogénicas como los solventes orgánicos. Este estudio es viable, ya que se cuenta con los reactivos requeridos, la infraestructura adecuada y la asesoría de personas capacitadas para el asesoramiento durante la ejecución del estudio. Además su desarrollo brindará un valioso aporte a la literatura científica por que se espera divulgar los resultados del estudio en eventos y publicarlo en una revista científica.

3. ANTECEDENTES

3.1 ESTUDIOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS PRESENTES EN EL TÍNER

Según la IARC existe “suficiente evidencia” de carcinogenicidad entre pintores, pero no hay suficiente evidencia de carcinogenicidad con los fabricantes de pinturas. Los cánceres, de pulmón, esófago, estomago, vejiga son los más frecuentes, pero también registra cáncer de cavidad bucal, laringe y leucemia. Además en pintores se reportan problemas de esterilidad, frecuencia espontánea de aborto entre mujeres y malformaciones congénitas (IARC, 1989).

Se han realizado muchos estudios donde se evalúan los efectos neurotóxicos y hematológicos de los químicos que conforman el tiner por separado, como el benceno tolueno, xileno, entre otros (EPA. 1985.), de acuerdo a estos estudios se ha determinado, al benceno como un potencial carcinógeno humano (IARC, 1987); y se concluye que la exposición a tolueno y xileno por separado no tiene ningún efecto carcinogénico para el hombre (NTP, 2001); esto se ha podido determinar con ayuda de sistemas animales, en lo que se refleja la falta de evidencia en la clasificación de la no carcinogenicidad del tolueno y xileno en humanos (IARC, 1999).

Por otra parte se ha evaluado el daño citogenético por exposición ocupacional a solventes orgánicos en trabajadores de imprentas, usando biomarcadores de efecto como ICHs, ACs y MNs en linfocitos de sangre periférica; encontrándose

Es importante resaltar que no existen estudios, en donde se evalúe efectos genotóxicos por la exposición a mezclas complejas de solventes orgánicos (U.S Department of Health and Human Services, 2004) como el tiner. pero según datos recopilados de un modelo cuaternario predictivo de una base fisiológicamente farmacocinética (PBPK) de la concentración del benceno(B), tolueno (T), etilbenceno (E) y xileno (X) en la sangre hepática venosa en Ratas, después de una exposición por inhalación de 4 horas a 100 ppm de benceno solo y combinado con el tolueno, ethylbenceno y/o xileno, se ha establecido un aumento en la concentración de algunos de los solventes, mostrando un efecto aditivo potencializando la toxicidad entre el benceno, tolueno y/o xileno (Haddad, et al., 1999)

3.2 EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO GSTT1 Y GSTM1 SOBRE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y RIESGO DE CÁNCER.

Diferentes polimorfismos genéticos en la biotransformación de xenobióticos, han sido investigados, entre ellos algunos relacionados con la susceptibilidad a problemas de salud como el cáncer. En la fase II del metabolismo, se encuentra la familia Glutathion S-Transferasas (GSTs), dentro de esta familia de multigenes los más estudiados: GSTT1 y GSTM1, están involucrados en la detoxificación de compuestos potencialmente carcinogénicos (Murata, 1998). El interés en estos genes, ha sido estimulado por los estudios que indican que los individuos homocigóticos nulos para GSTT1 y GSTM1, están asociados al riesgo creciente de varias enfermedades como el cáncer (Hatagima, 2002).

Algunas publicaciones evidencian que la delección homocigótica del gen GSTM1, constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón, especialmente en fumadores (Williams, et al., 1995). Otro estudios llevados a cabo en las poblaciones japonesas y chinas, han asociado el genotipo GSTT1 y GSTM1 nulo, con cáncer gástrico (Lee, 2006; Bernardini, *et al.*, 2002; Cai, *et al.*, 2001), encontrando mayor prevalencia del gen delectado de GSTT1 y GSTM1, en los pacientes con cáncer comparados con el grupo control (Torres, Sicard, Groot, 2004; Setiawan, *et al.*, 2000; Lan, *et al.*, 2001). Resultados de otras investigaciones indican que trabajadores expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) con GSTM1 delectado, presentan un incremento en el riesgo de adquirir cáncer de vejiga (Binková, et al., 1997). Existen evidencias, acerca de la variación inter-individual en el metabolismo de xenobioticos en humanos con el riesgo de enfermedad por exposición al benceno (Sram, 1998).

Sin embargo, el grado de susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades depende de la combinación de los genotipos de riesgo que posea cada individuo, Por lo que se hace necesario seguir evaluando los genes que participan en el metabolismo de xenobióticos, reparación del ADN, control del ciclo celular, etc., para entender el papel que juegan los factores genéticos en la determinación de la susceptibilidad individual (Setiawan, *et al.*, 2000).

3.3 ESTUDIOS *IN VITRO*

En un estudio para identificar el daño genotóxico causado por mezclas complejas como el humo del cigarrillo y algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); se concluyó que la utilización de pruebas *in vitro* era la mejor herramienta para identificar los diferentes daños genotóxicos causados por exposición a estos compuestos mixtos (Rinsky, *et al.*, 1987), esto debido a la alta sensibilidad de este método, para la comprensión del efecto toxico del químico en el organismo, puesto que permite extrapolar los datos obtenidos en las pruebas a humanos prediciendo así su efecto (Eisenbrand, *et al.* 2002).

3.3.1 Respuesta *in vitro* a la exposición de los componentes del tñer asociados con los polimorfismos en las enzimas metabólicas. Un factor importante, para determinar si el efecto de un polimorfismo genético puede ser visualizado en un biomarcador citogenético, es examinando la expresión de los diferentes genotipos en células o tejidos (Norppa, 2004), un ejemplo claro es, la Glutation S-transferasa T1 (GSTT1) y M1(GSTM1), expresados en leucocitos y eritrocitos respectivamente (Landi, *et al.*, 1996; Norppa, 2004). Varios estudios se han dirigido una pregunta ¿los polimorfismos genéticos afectan el nivel basal de los biomarcadores citogenéticos, sin tener en cuenta la exposición específica de agentes genotóxicos?, llegando a la conclusión, que si se muestra influencia de los genotipos en la frecuencia de los biomarcadores, igualmente en grupos controles y expuestos (Norppa, and Hirvonen, 2000).

De acuerdo a los resultados arrojados en investigaciones, se sabe que la respuesta biológica al tratamiento químico, depende del genotipo (Pérez, *et al.*, 2006), por lo que es importante resaltar el papel de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1, que consiste en determinar la susceptibilidad individual a químicos que inducen daño citogenético (Norppa, *et al.*, 1997); un ejemplo claro, son los estudios *in vitro* realizados en linfocitos de sangre periférica humana, con genotipo nulo para GSTT1 y GSTM1, mostraron un incremento significativo en los biomarcadores citogenéticos tanto de exposición, como de efecto, correspondientes a la inducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y alteraciones cromosómicas (ACs), por exposición a compuestos químicos como: la hidroquinona (toxina resultante del metabolismo del benceno) (Silva, *et al.*, 2004), Diepoxibutano (DEB) (Landi, *et al.*, 1996), 1,3- butadieno (Lan, *et al.*, 2001) y estireno (Bernardini, *et al.*, 2002; The Nordic study group on the health risk of chromosomic damage. 1990).

3.3.2 Prueba de alteraciones cromosómicas (ACs) como biomarcador. La relevancia del incremento en la frecuencia de alteraciones citogenéticas es determinar el riesgo de cáncer, esto se reporta por estudios epidemiológicos donde se sugiere que una alta frecuencia de ACs predice un mayor riesgo de cáncer. (Hukkanen, 2000). La prueba de alteraciones cromosómicas (ACs), es un importante biomarcador de efecto, sensible a la exposición de mutágenos carcinogénicos (Hagmar, *et al.*, 1998).

Luego de hacer una amplia revisión bibliográfica en bases de datos como PubMed, Science Direct ISI web of knowledge, Springer y Hinary, concluimos que son pocos los estudios que relacionan el daño genotóxico inducido por los solventes orgánicos y biomarcadores de susceptibilidad y que no existen investigaciones que tengan como objetivo de estudio, la evaluación genotóxica mediante el efecto modulador de los polimorfismos de las enzimas metabólicas y la acción in vitro del tiner como solvente orgánico de composición mixta; por lo que se hace importante el desarrollo de este estudio.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto genotóxico del tiner en linfocitos humanos y la modulación por el polimorfismo de los genes del metabolismo GSTM1 y GSTT1.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar el polimorfismo de los genes del metabolismo GSTT1 y GSTM1 en individuos saludables para seleccionar los donadores de las muestras sangre.

Evaluar el efecto citotóxico del tiner en linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* mediante la prueba de índice mitótico (IM).

Establecer el efecto genotóxico del tiner en linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* utilizando la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs).

Determinar la asociación del efecto genotóxico del tiner en linfocitos humanos (*in vitro*) y el polimorfismo de los genes del metabolismo GSTM1 y GSTT1.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. SOLVENTES ORGÁNICOS

Los solventes se conocen como sustancias orgánicas capaces de disolver una gama amplia de compuestos para formar una solución uniforme, los cuales son empleados en amplia variedad de aplicaciones en el hogar e industrias a nivel mundial [29]. Los solventes son hidrocarburos líquidos más o menos volátiles, entre los cuales pueden mencionarse compuestos aromáticos, alicíclicos, alifáticos, alcoholes, cetonas, ésteres y éteres, teniendo como principal uso la fabricación de pinturas con disolventes como el xileno, tolueno y estireno [13], entre otros usos están la extracción de grasas, aceites, adhesivos, plásticos, textiles y productos intermedios en procesos de síntesis orgánicas [30-31].

Aunque estos compuestos poseen muchas propiedades útiles en las diversas actividades del ser humano, ellos representan un riesgo potencial en la salud del hombre. Estos efectos adversos incluyen toxicidad en el sistema nervioso central, sistema pulmonar, sistema hematopoyético, hígado, daño renal y absorción cutánea [10], a concentraciones bajas o moderadas los solventes orgánicos pueden causar síntomas temporales como euforia, dolor de cabeza y vértigo. En concentraciones altas generan adormecimiento y perturbaciones en la respiración y circulación y puede llevar a la muerte [31]. Aproximadamente, del 50 al 60% de la cantidad inhalada es absorbida por el organismo. Dentro de sus componentes, se sabe que el estireno tiene actividad genotóxica y sólo han mostrado algunos indicios de actividad cancerígena en experimentos con animales [32]; al igual se especula que el tolueno es el solvente cuyo metabolismo es poco afectado por la co-exposición a otros solventes; de hecho el tolueno es el solvente más ampliamente metabolizado ya que tiene la afinidad global más alta en el sistema de enzimas metabólicas de xenobióticos en el organismo [33].

5.2. TÍNER

En el mercado existen tantos solventes como compuestos no solubles en agua, siendo uno de los más populares, el tiner [34]. El solvente para pinturas, adelgazador de pinturas o tiner, tiene como solvente principal al tolueno, como

cosolvente al benceno y como diluyente a una serie de solventes accesorios; sustancias, todas ellas, tóxicas para el hombre (Ver tabla No 1). [10]. La razón de ser, de la composición de los solventes radica en la economía, ya que el solvente activo tiene un costo tan elevado que resultaría imposible utilizarlo de forma pura. Por ello le es agregado un diluyente que, al darle volumen, aumenta su aprovechamiento y un cosolvente que mantiene su efecto y lo potencia [31,35].

Tabla 1. Componentes del Tíner, 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	----

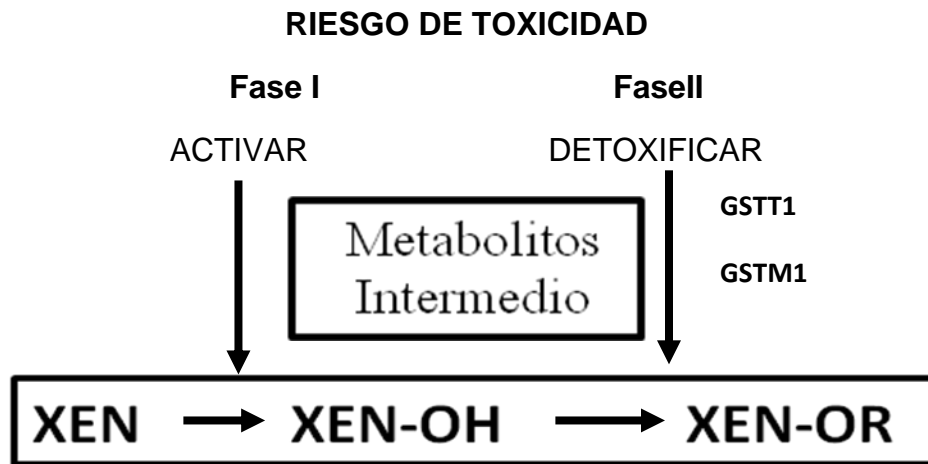
□ 50 compuestos más con una masa < 1%

Fuente: ECOPETROL, 2003.

5.3. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS (BIOTRANSFORMACIÓN)

La biotransformación, es un proceso que lleva a una conversión metabólica de los compuestos extraños (xenobióticos) presentes en el organismo. Suele denominarse también metabolismo de xenobióticos. Por regla general, el metabolismo convierte los xenobióticos liposolubles en grandes metabolitos hidrosolubles que pueden extraerse con facilidad [36]. Los seres humanos y otros mamíferos poseen un sistema enzimático metabólico sumamente complejo, que comprenden más de una docena de superfamilias enzimáticas distintas. Prácticamente todas los solventes (benceno, tolueno, xileno, entre otros) a los que el hombre se encuentra expuesto, son modificadas por estas enzimas facilitando su eliminación del organismo. Desde hace más de cuatro décadas, los procesos metabólicos mediados por estas enzimas se suelen clasificar como reacciones de la fase I o de la fase II (Figura 1) [37].

Figura 1. Biotransformación de xenobióticos



Fuente: Modificada <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>

Entre biotransformación y toxicidad hay una relación compleja; puede entenderse la biotransformación como un proceso necesario para la supervivencia, ya que protege al organismo de la toxicidad impidiendo que se acumulen en él sustancias nocivas, sin embargo en ese proceso pueden formarse productos intermediarios, como metabolitos reactivos que son potencialmente nocivos. Este fenómeno se denomina activación metabólica; de esta manera, la biotransformación puede también inducir toxicidad. Los metabolitos intermedios oxidados que no se conjugan pueden unirse a estructuras celulares y dañarlas [38].

5.3.1. Enzimas de la fase I. En esta fase se encuentra el sistema metabolizador más importante, el Citocromo P450 (CYP450), que se encuentra distribuido en muchos tejidos, siendo más abundante en el hígado [39]. La principal función del CYP450 es participar en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son transformados en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo [40]. Aunque la principal función de las reacciones de la fase I de detoxificación es convertir los xenobióticos en compuestos que puedan ser eliminados del organismo con mayor facilidad, también se presentan casos en que los productos metabólicos son más tóxicos que el compuesto original. Estos intermedios reactivos pueden estar involucrados en la iniciación de eventos que darán paso a la muerte celular, cáncer inducido por químicos y teratogénesis.

5.3.2. Enzimas de la fase II. En esta fase se encuentra la Glutathion S-Transferasa (GST), una familia de multigenes que codifican para enzimas diméricas solubles, que incluyen los tipos alfa (α), mu (μ), pi (π), zeta (ζ), sigma (σ), kappa (κ), omega (ω) y theta (τ), con amplia y específica distribución subcelular [22]. Las enzimas de GSTs están involucradas en el metabolismo de una gama amplia de compuestos electrofílicos, de origen tanto exógenos como endógenos [41]. Su función principal es la detoxificación de compuestos contaminantes, carcinógenos y mutágenos, por conjugación con glutathion (GSH) [42]. También, juegan un papel en la protección de tejidos contra especies reactivas de oxígeno (ROS) e hidroperóxidos lipídicos durante el estrés oxidativo [43]. Dos de los miembros de familia de multigenes glutathion S-transferasa, son genes candidatos de susceptibilidad al cáncer, debido a su capacidad de regular la conjugación de compuestos cancerígenos y de excretarlos en forma de metabolitos hidrofílicos [22,44-45].

En esta fase del metabolismo, se encuentra el gen GSTT1 perteneciente a la familia teta (τ), localizada en el cromosoma 22 en la región q11.2 [46], la cual tiene como funciones activar e inactivar sustancias químicas, como principales sustratos encontramos el diclorometano, óxido de etileno, 1,3-butadieno y el etano. [27, 144, 21, 54], y puede sustituir la acción de GSTM1 cuando este se encuentra delectado [47]. Además, encontramos el gen de la familia mu (μ), GSTM1, localizado en el cromosoma 1 en la región p13.3, cerca de algunos proto-oncogenes; la enzima que codifica este gen tiene como función principal, detoxificar metabolitos de HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) [48].

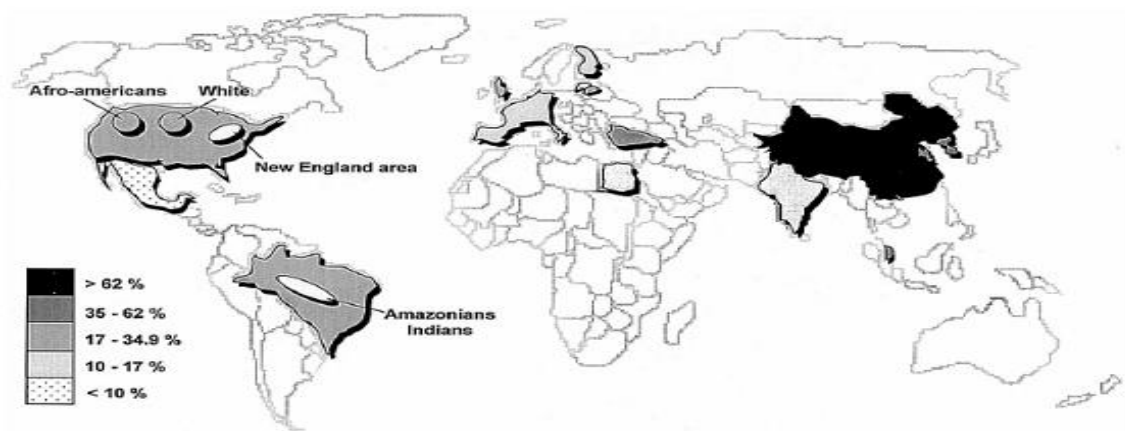
5.4. POLIMORFISMO Y SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA.

El polimorfismo genético es una variación heredada que se define como cualquier cambio estructural de un alelo, que lo diferencia del alelo normal en la población en general, cuyo valor es mayor o igual al 1% [16]. Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNP's, y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos [49]. En la población humana se han identificado un número amplio de polimorfismos en genes que participan en procesos celulares fundamentales como ciclo celular, reparación celular, muerte celular, metabolismo entre otros [50].

En humanos, se conocen, cerca de 30 familias de genes que codifican para enzimas metabolizadoras de xenobióticos, que presentan polimorfismos. Esta variabilidad suelen ser responsables de alteraciones funcionales y, además, proporcionan una base genética para explicar la susceptibilidad individual a ciertas patologías [51]. Los polimorfismos metabólicos que han sido asociados de forma más consistente con el aumento de riesgo de cáncer incluyen al citocromo P450, la glutatión S-transferasa y la N-acetil-transferasa [52]. Las enzimas de la fase II del metabolismo, son moduladoras del riesgo de cáncer y otras enfermedades; por lo que es claro que la interacción gen-ambiente explican las variaciones en la respuesta biológica a la exposición ambiental [53].

5.4.1. Polimorfismo del gen GSTT1. El gen presenta dos alelos polimórficos en la población: el tipo silvestre que contiene el gen (GSTT1+) y el mutante nulo (GSTT1 (0)). En consecuencia, los individuos pertenecen a uno de los siguientes genotipos: Homocigoto: GSTT1 +/+; Heterocigoto: GSTT1 +/- y el Homocigoto mutante GSTT1 0/0 consiste en la delección total del gen y por tanto no hay expresión de la enzima. El polimorfismo de GSTT1 difiere en la frecuencia entre los diferentes grupos étnicos [54].

Figura 2. Frecuencia del genotipo GSTT1nulo en el mundo.



FUENTE: Landi, S. Review: Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens. En : Mutation Research. Vol. 463 (2000); p. 247–28

La prevalencia de GSTT1 nulo en individuos muestra una amplia variación entre las diferentes poblaciones étnicas [45] (figura 2), alrededor del 20% de los caucásicos [145] y el 80% de los asiáticos carecen de la enzima [121], la frecuencia del genotipo nulo es más alta entre chinos (64.4%) seguido por los

coreanos (60.2%) [146-147]; entre los afroamericanos la frecuencia es de 20 a 24% [148], turcos 19.3% (confidencial limita 12.2–27.7%) [149], indios 16%, y egipcios 14.7% [150], considerando que el predominio del genotipo es bajo entre los mexicoamericanos (9.7%) [143-151]. En EE.UU. la población blanca muestra una frecuencia del genotipo nulo similar a la población Caucásica (23.7%). En Brasil, la frecuencia del genotipo nulo es 18.5% y 19% entre caucásicos y los descendientes africanos, respectivamente, entre los indios amazónicos es de 11% [152]. La relación entre el fenotipo y la incidencia del cáncer ha sido investigada extensamente con el fin de detectar diferencia en la susceptibilidad a agentes carcinógenos asociados con el genotipo GSTT1 [121].

5.4.2. Polimorfismo del gen GSTM1. Los individuos pueden poseer uno de los siguientes genotipos: Homocigótico: GSTM1+/+ presencia del gen silvestre; Heterocigótico: GSTM1+/0 y Homocigótico: GSTM1 0/0 (o genotipo nulo) consiste en la delección total del gen y por lo tanto no hay expresión de la enzima. Se ha demostrado que la pérdida de esta actividad detoxificante, está asociada con el desarrollo de varios tipos de cáncer [55].

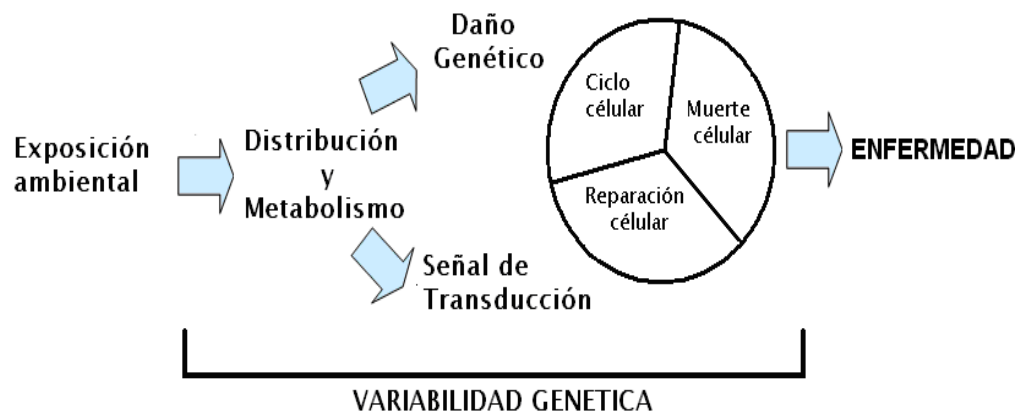
La variabilidad en la distribución del fenotipo nulo de GSTM1, debido a la delección total o parcial del gen que produce la falta de la acción enzimática, ha sido notificado en diferentes poblaciones, sobre todo en los grupos étnicamente bien definidos [37]. Una evaluación del polimorfismo del gen GSTM1 en individuos saludables mostró que el genotipo nulo ocurre en aproximadamente 23 a 48% en las poblaciones africanas; 33 a 63% en las poblaciones asiáticas [148, 157-158], revisando trabajos que estudiaron el grupo control para el polimorfismo del gen GSTM1, se concluyó que la ausencia del gen se encuentra en aproximadamente 47% de la población japonesa y 49% de la población Caucásica [159]. Según Crump, *et al.*, [160] estudios que involucran las muestras de las poblaciones Caucásicas norteamericanas que la ausencia del gen GSTM1 pasa en aproximadamente 48-57% de los individuos analizados.

Las personas que son portadores de delecciones homocigóticas en los genes GSTT1 y GSTM1 pueden tener una alteración en la capacidad metabólica de eliminar compuestos cancerígenos y pueden, por tanto, tener un mayor riesgo de desarrollar cáncer [22-56]. Las isoenzimas polimórficas detoxificadoras GSTM1 y GSTT1 se expresan en los linfocitos y eritrocitos humanos de sangre periférica respectivamente [6-57]. Los riesgos de salud por la exposición a agentes tóxicos son modulados por la susceptibilidad del individuo, que puede ser heredada y/o adquirida. Es importante tener en cuenta que no todas las personas son igualmente susceptibles a la exposición ambiental/ocupacional y que la

susceptibilidad genética modula el riesgo de desarrollar problemas de salud (figura 3). [58].

La susceptibilidad a los agentes genotóxicos exógenos y endógenos puede ser debida a los polimorfismos genéticos de las enzimas metabólicas de xenobióticos (EMXs), produciendo un incremento en la activación metabólica o la disminuida de la detoxificación [59]. Un gran número de polimorfismos genéticos, han sido identificados en los genes que codifican para las enzimas del metabolismo de xenobióticos, pero solamente unos pocos, están asociados a cambios en la actividad enzimática que pueden ser responsables de modificar la respuesta biológica a agentes genotóxicos como los solventes orgánicos [60].

Figura 3. Susceptibilidad al medio ambiente



Fuente: Modificada <http://www.niehs.nih.gov/envgenom/egp5.htm>

5.5 BIOMARCADORES

Los biomarcadores pueden ser definidos como las alteraciones homeostáticas inducidas por químicos a nivel molecular, bioquímico o celular. Son de gran importancia por su uso y aplicación para la identificación de la naturaleza y cuantificación de la exposición química a nivel ambiental y ocupacional. Pueden ser aplicados en estudios experimentales o en el campo de monitoreo y pueden ser destructivos o no al organismo de estudio. Los biomarcadores moleculares son típicos indicadores de exposición, efecto, susceptibilidad y respuesta [197, 198]. Un biomarcador de exposición indica la presencia de una exposición previa a un agente ambiental; un biomarcador de efecto indica la presencia (y magnitud) de

una respuesta biológica a la exposición a un agente ambiental; un biomarcador de susceptibilidad indica una elevada sensibilidad a los efectos de los agentes ambientales y por último, un biomarcador de respuesta supervisa cuantitativa y cualitativamente la sucesión de cambios asociados con el stress celular inducido por xenobióticos y la toxicidad en múltiples tejidos.

5.6. EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO*

Los estudios *in vitro*, proporcionan herramientas importantes para reforzar la comprensión del efecto de los químicos, extrapolando de *in vitro* a humano [63]. Por otra parte este tipo de pruebas permite al investigador tener total control sobre los factores que pueden intervenir en los ensayos. Estas pruebas también son de gran utilidad en la identificación de la especificidad del efecto o acción del químico dentro del organismo [9]. Los linfocitos humanos son células valiosas para realizar estudios de experimentación *in vitro*; se obtienen fácilmente, mediante métodos poco invasivos para los individuos donadores, además permite controlar las variables físico-químicas presentes en todo proceso biológico para el desarrollo óptimo del experimento. Los linfocitos se encuentran en un estado no proliferativo y tienen una vida media de aproximadamente 4 meses y pueden acumular daños por exposiciones repetidas y así ser un tipo de célula ideal para detectar daño por exposición crónica a bajas dosis de agentes dañinos [61].

5.7. CITOTÓXICIDAD

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro*, son de gran utilidad, para establecer la capacidad intrínseca, de un compuesto para causar la muerte celular como una consecuencia de daño a las funciones básicas celulares; son necesarias para proporcionar una información más detallada sobre los parámetros de la genotoxicidad, como también en la inducción de mutaciones o muerte celular programada. Otra de sus ventajas es establecer la dosis letal 50 (es decir TC50), es posible comparar cuantitativamente las respuestas de uno o varios compuestos en diferentes sistemas [61].

5.7.1. Índice mitótico (I.M%). La prueba de índice mitótico se emplea como biomarcador de proliferación celular, es ampliamente utilizada para medir la proporción de células en la fase M del ciclo celular; La técnica de IM se aplica para

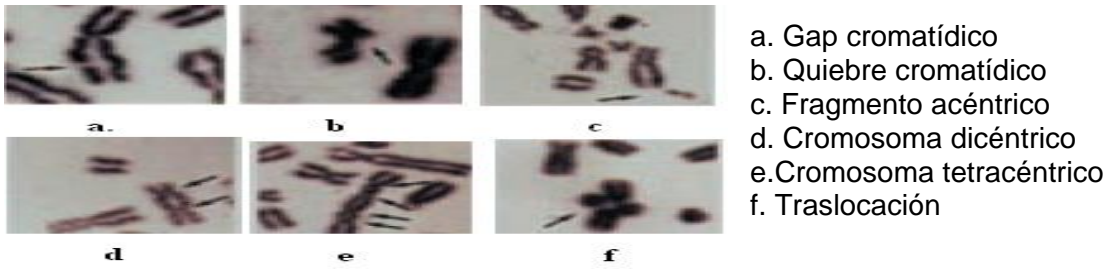
acumular células en metafase y facilitar así los estudios citogenéticos, evaluando el efecto de dosis o relación dosis-efecto [62].

5.8. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs)

La prueba de alteraciones cromosómicas (ACs), permite identificar alteraciones de tipo numérico y de tipo estructural (figura 3); estas alteraciones son la expresión de las lesiones primarias causadas en el DNA, las cuales conducen a la discontinuidad de la doble hélice del DNA [64]. Son daños irreversibles, no reparados y acumulados durante varios años de exposición antes de la prueba, expresados luego de sucederse una primera división *in vitro* y usados como indicadores de exposición de una población expuesta a agente químicos [65]. La mayoría de estos agentes químicos son llamados dependientes de la fase S, de acuerdo a el tiempo de inducción de los daños durante el ciclo celular. Las alteraciones cromosómicas estructurales se dividen en: alteraciones cromatídicas (ACTs) y alteraciones cromosómicas (ACSs); para la formación de ACs se requiere la producción de la lesión primaria, que consiste en uno o varios quiebres de cadena doble del DNA [66-67]. Las ACs pueden conducir a la muerte celular en pocos ciclos celulares, por esta razón, es importante examinar las células en la primera metafase post-tratamiento [68].

5.8.1. Significancia biológica. La prueba de alteraciones cromosómicas (ACs) *in vitro* en linfocitos humanos de sangre periférica (PBL), permite evaluar el efecto genotóxico causado por la exposición ocupacional/ambiental [7,69] y validado a nivel mundial como biomarcador de efecto debido a que la frecuencia alta de alteraciones cromosómicas esta asociada directamente con el riesgo a padecer cáncer [70]; estas alteraciones que pueden ser originadas ya sea por una exposición ocupacional/ambiental o por la susceptibilidad individual que está determinada por los polimorfismos genéticos [71]. Es un biomarcador de efecto, validado y fiable en la predicción de ocurrencia de cáncer en humanos, ya que permite identificar posibles daños en la totalidad del genoma, por lo que es un excelente indicador de riesgo, frente a la exposición a agentes genotóxicos; también facilita la determinación de agentes mutagénicos y carcinogénicos (Teratogénicos) [70].

Figura 4. Ejemplos de alteraciones cromosómicas estructurales.



Fuente: Cell Proliferation, Sister Chromatid Exchanges, Chromosome Aberrations, Micronuclei and Mutation Rate.

6. METODOLOGÍA

6.1. QUÍMICOS

RPMI-1640 Medium Liquido (Sigma), Antibiótico antimetabólico (Sigma), Suero Bovino Fetal (Invitrogen), Fitohemaglutinina (Sigma), L-glutamina (Sigma), Colcemid, Metanol absoluto analítico (Mallinckrodt), Acido Acético (Sigma), Giemsa (Aldrich).Dimetilsulfoxido(DMSO) (Carlo Erba), Mitomicina C (MMC) (Sigma), Tíner 0.14, Histopaque (Sigma), PBS estéril pH 7.2 (Complex), Kit Deoxinucleotidos dNTP 10mM (Promega), Marcador molecular 100pb DNA ladderx250ul, con rango de 100 a 1.500pb (Promega), Agarosa NUSIEVE 3:1(Cambrex), Tap polimerasa con buffer A y MgCl₂ (Promega), Tap polimerasa reversa (Invitrogen), Kit QIAAMP DNA blood mini (QIAGEN), Bromuro de etidio (AMRECO), Primers GSTT11Fx23b (INVITROGEN), Primers GSTT12 Rx20b,Primers GSTM11FX21b, Primers GSTM12Rx22b y Primers CYP1A1-1x21b (INVITROGEN).

6.2. TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo experimental *in vitro*, empleando cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, tratados con diferentes concentraciones de tiner. Presenta una investigación comparativa o de prueba de hipótesis, que permitirá identificar una relación causa-efecto, y además, medir el efecto de interacción de las variables a estudiar (cuadro 1). Para lograr esto se establecieron tres grupos de estudio, el grupo control negativo (DMSO), el grupo experimental conformado por las diferentes concentraciones de tiner y el grupo control positivo (MMC). Se realizó un diseño de bloques aleatorizados, agrupando las unidades experimentales en bloques y determinando la distribución de los tratamientos en cada uno. Se llevó a cabo este tipo de diseño debido a que se tiene control sobre la asignación de tratamientos mediante un proceso aleatorio y porque es posible prevenir la introducción de sesgos y lograr altos índices de validez. Se estableció al cultivo de linfocitos humanos como unidad de análisis experimental y de muestreo.

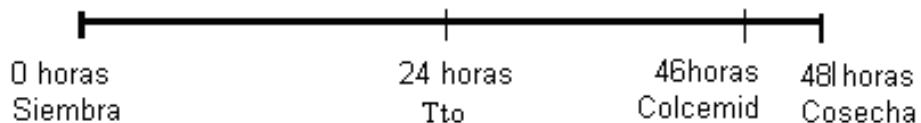
Cuadro 1. Descripción de variables

VARIABLE	CLASIFICACIÓN	TIPO	ESCALA DE MEDIDA
Alteraciones Cromosómicas	Dependiente	Cuantitativa discreta	Razón
Tratamientos(DMSO, Tíner y MMC)	Independiente	Cualitativo	Ordinal
Polimorfismo (GSTM1 Y GSTT1)	Independiente	Cualitativo	Nominal
Índice mitótico	Dependiente	Cuantitativa	Razón

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.3.1 Prueba citotóxica. Para determinar el efecto citotóxico del tíner en sangre total periférica humana, se empleó la técnica de índice mitótico (I.M) (Figura 5), para la cual se recomienda evaluar ocho concentraciones de la sustancia (tíner) e incluir un control negativo (DMSO) y un control positivo (MMC), para tener un total de 10 tratamientos cada uno con un duplicado y se repitió el experimento 6 veces (Cuadro 2). En cada cultivo se contaron 2000 células [28]. Los tratamientos se establecieron, partiendo de las concentraciones utilizadas en un trabajo previo [72].

Figura 5. Protocolo de la prueba de índice mitótico (IM).



Cuadro 2. Diseño experimental *in vitro*. Prueba citotóxica para el registro de índice mitótico (I.M%).

PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO (IM%)								
Grupos	Tratamientos	Concentración Final en el cultivo (µL/mL)	Vol. Ttos. (µL)	No. De cultivos por experimento	No. placas por cultivo	Células analizadas por tratamiento	No. de experimentos	Análisis Estadístico
Control negativo	DMSO	1%	50	2	2	2000	6	Distribución normal de datos: Shapiro-Wilk. Homogeneidad de varianzas: Levene Paramétrico: Tukey comparaciones múltiples Correlación: Pearson
Experimental	Tíner	0.08µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.10µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.20µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.30µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.40µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.50µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.60µl/mL	50	2	2	2000	6	
		0.80µl/mL	50	2	2	2000	6	
Control positivo	MMC	0.0025µg/mL	50	2	2	2000	6	

DMSO= Dimetilsulfoxido.

MMC= Mitomicina C.

Cuadro 3. Diseño experimental *in vitro*. Prueba genotóxica para el registro de alteraciones cromosómicas (ACs) y los polimorfismos de los genes GSTT1 y GSTM1.

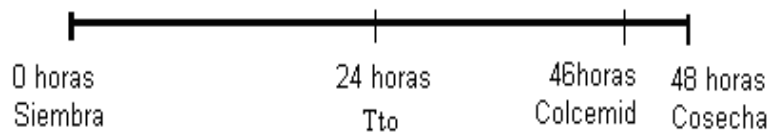
PRUEBA GENOTOXICA								Análisis Estadístico
GENOTIPOS		Tto. Químico	Concentración Final (µl/mL)	Vol. Ttos (µl)	Nº metafases analizadas	No. de cultivos por experimento.	No. de experimentos	
GSTT1	GSTM1							
+	+	DMSO	1%	50	100	2	5	No paramétrico: Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney
		Tíner	0.10	50	100	2	5	
			0.35		100	2	5	
			0.50		100	2	5	
		MMC	0.025µg/ml	50	100	2	5	
+	-	DMSO*	1%	50	100	2	5	
		Tíner	0.10	50	100	2	5	
			0.35		100	2	5	
			0.50		100	2	5	
		MMC	0.025µg/ml	50	100	2	5	
-	+	DMSO	1%	50	100	2	5	
		Tíner	0.10	50	100	2	5	
			0.35		100	2	5	
			0.50		100	2	5	
		MMC	0.025µg/ml	50	100	2	5	
-	-	DMSO	1%	50	100	2	5	
		Tíner	0.10	50	100	2	5	
			0.35		100	2	5	
			0.50		100	2	5	
		MMC	0.025µg/ml	50	100	2	5	

DMSO= Dimetilsulfoxido.

MMC= Mitomicina C.

6.3.2. Prueba Genotóxica. Para este análisis se utilizó la prueba de alteraciones cromosómicas (Anexo 1), debido a que permite evaluar el daño genotóxico inducido en los linfocitos por el tiner teniendo en cuenta las variables presentes en el cuadro 3. Para la identificación de ACs se tuvieron en cuenta solo células con 46 cromosomas, se analizaron 100 metafases en el primer ciclo de división celular por persona, criterio usado para determinar cromosomas dicéntricos, deleciones, anillos acéntricos, céntricos, inserciones, quiebres y intercambios [28]

Figura 6. Protocolo de la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs).



En el estudio la variable independiente (factor) fueron los genotipos correspondientes a GSTT1 y GSTM1 (Total=4), estos se combinaron con los tres niveles del químico que son: Dimetil Sulfoxido (DMSO), concentraciones de Tiner (baja, media, alta) y Mitomicina C (MMC) (Figura 6); en consecuencia se incluyeron en el estudio 5 tratamientos. En cada experimento se analizaron 4 muestras de sangre de diferente donante (una de cada genotipo) y por cada muestra se hicieron 10 cultivos, para aplicar el tratamiento químico por duplicado, en total se realizaron 40 cultivos por experimento; para cubrir a los 20 donantes, cada experimento debió repetirse 5 veces.

6.4. SELECCIÓN DE DONANTES

El grupo de investigación de toxicología genética y citogenética de la Universidad del Cauca, cuenta con una amplia base de datos de los genotipos de los donantes que han participado como personas objeto de estudio a cargo de éste grupo. Se seleccionaron 21 individuos saludables de género masculino, que no se encontrarán expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos. Para la prueba de citotoxicidad evaluada mediante I.M, fue escogido un donante para participar en las 6 replicas del experimento; con los 20 donantes restantes, se conformaron 4 grupos con diferentes combinaciones de genotipos, de 5 personas cada uno, con relación a los genes GSTT1 y GSTM1 (ver tabla 2). Cabe aclarar que los participantes de este estudio aceptaron y firmaron voluntariamente un consentimiento informado donde se especificó el objetivo del estudio, los riesgos y

beneficios de la participación en él (Anexo 2). Las muestras de sangre fueron obtenidas según los procedimientos específicos y manipuladas conforme a las normas éticas establecidas.

Tabla 2. Juego de genotipos encontrados en la población no expuesta a solventes orgánicos.

GRUPO	GENOTIPO	
	GSTM1	GSTT1
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-

Como criterios de inclusión se tuvo en cuenta que los donadores, no hubieran padecido recientemente de infecciones virales o bacterianas, no haber recibido radiaciones en los últimos 6 meses antes del estudio y que no hayan ingerido drogas psicoactivas o algún medicamento (antiparasitarios, antibacterianos etc.) en los 30 días previos a la toma de la muestra y que no consumieran cigarrillo ya que todos estos factores pueden influir en los resultados.

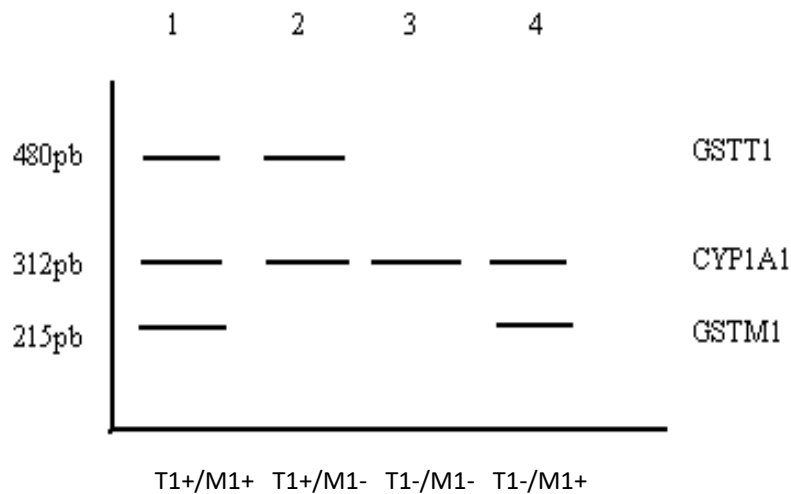
6.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS GENES DE LA GLUTATION-S-TRANSFERASA GSTT1 Y GSTM1

6.5.1. Aislamiento y extracción de linfocitos humanos de sangre total con histopaque para extracción de ADN genómico. Para el aislamiento de linfocitos se tomó una muestra de sangre de 15 mL a cada uno de los donantes (figura 6); se realizó por el procedimiento de gradiente Ficol-Histopaque (Anexo 3). Luego los linfocitos aislados fueron lavados tres veces con PBS y centrifugados a 1200rpm por 12min. En la extracción de DNA genómico se empleo el kit Qiagen para extracción de DNA, el producto fue traspasado a un tubo criogénico previamente rotulado para ser mantenido congelado a -20°C. para posterior análisis de polimorfismos genéticos.

6.5.2. Polimorfismo genético. Para el análisis de los polimorfismos genéticos se hizo la amplificación de los fragmentos de DNA de interés por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR multiplex) para los genes GSTT1 y GSTM1 y empleando CYP1A1 como control interno, esta técnica fue estandarizada de acuerdo a los protocolos publicados [48,73] (Anexo 4). El perfil del PCR multiplex consiste en: 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de amplificación y cada ciclo consistente de una desnaturalización a 94°C por 2 min cada uno, una fase de alineamiento de los primers a 59°C por 1 min y una fase de extensión inicial o polimerización a 72°C por 1 min. La reacción fue terminada con 1 ciclo de extensión o polimerización final a 72°C por 10 min.

6.5.3. Análisis de los polimorfismos genéticos. El polimorfismo por delección de los genes GSTT1 Y GSTM1 se detectó por la presencia o ausencia de una banda de 480pb para el gen GSTT1 y una banda 215pb para el gen GSTM1 (Figura 7), sobre un transluminador con luz ultravioleta.

Figura 7. Patrón de bandas de los productos de la amplificación de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1 por PCR multiplex.



En la figura 7 se observa la representación de una electroforesis en geles de agarosa al 2% coloreada con bromuro de etidio, se espera obtener: los carriles 1, 2, 3, 4 muestran una banda de 312pb que corresponde al gen CYP1A1 (control interno); en los carriles 1 y 2 se observa una banda de 480pb que corresponde a la presencia del gen GSTT1 y en los carriles 1 y 4 poseen una banda de 215pb correspondiente a la presencia del gen GSTM1.

6.6. PRUEBAS BIOLÓGICAS

6.6.1. Establecimiento de los cultivos. Se tomaron 5 ml de sangre periférica, con el fin de establecer cultivos de 5 ml para el registro de índice mitótico (I.M%) y alteraciones cromosómicas (AC) respectivamente cada uno con duplicado. Se tomarón 0.5ml de la sangre para cada tubo de cultivo de aproximadamente 5ml, la cual se le añadió a un medio de cultivo suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de L-glutamina. Los linfocitos fueron estimulados para su proliferación con 0.1ml de fitohemaglutinina (PHA) a cada tubo. Pasadas 24 horas se les aplicó el tratamiento (Control negativo (DMSO), concentraciones de tiner y control positivo (MMC). Los cultivos fueron incubados a 37°C por 48 horas.

6.6.2. Cosecha celular. Después de las 46 horas de establecido el cultivo se les adicionó 0.1ml de colcemid a cada tubo de cultivo y 2 horas más tarde se inició la cosecha centrifugando las células, se les aplicó choque hipotónico suave (30 min. KCl 0.075 M a 37°C), las células se centrifugaron de nuevo y se les añadió suavemente una solución fijadora, se refrigeraron por 20 minutos, se centrifugaron nuevamente y se repite el proceso de fijación dos veces, para terminar con la preparación de placas secas a temperatura ambiente por tres días y se realizó tinción con Giemsa al 6%.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos crudos de las pruebas de IM% y ACs, fueron registrados en las tablas de registro específicas para cada prueba (Anexo 5-6), se guardó el registro de las coordenadas de ubicación de las metafases que presentaron alteraciones cromosómicas; Estos datos se organizaron y se codificaron para ser analizadas con el paquete estadístico SPSS versión 13.

7.1. PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

Para el análisis del ajuste a la distribución normal y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos del porcentaje del índice mitótico (I.M %) con relación a las diferentes concentraciones de tiner, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, ($P > 0.05$), encontrando que los datos cumplen con los requerimientos mínimos para la aplicación de pruebas paramétricas. Para establecer la interacción entre el efecto *in vitro* de los tratamientos de tiner y el IM de los linfocitos humanos se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P > 0.05$) para varianzas homogéneas. Para determinar la relación dosis-efecto entre las concentraciones de tiner (variable independiente) y el I.M% (variable dependiente), se analizó mediante la correlación de Pearson ($P < 0.0001$).

Una vez analizados los resultados del I.M%, se escogieron tres concentraciones de tiner con las cuales se continuó con los experimentos planeados en el estudio, así: concentración baja, corresponde a la que tenga el I.M% semejante al grupo control; concentración media, la que disminuya el IM% al 50% respecto del control negativo; concentración alta, la que disminuya el IM% a un 20% obtenido en el grupo control. En la determinación del IM% se empleó la siguiente ecuación:

$$I.M = \frac{N^{\circ} \text{ CELL EN MITOSIS}}{N^{\circ} \text{ TOTAL DE CELL ANALIZADAS}} \times 100\%$$

7.2. PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

Para la identificación del efecto de los tratamientos de tiner con respecto a la frecuencia de ACs inducidas *in vitro* en los linfocitos humanos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.001$). En el análisis se tuvo en cuenta la siguiente ecuación:

$$A.C = \frac{\text{Nº ALTERACIONES CROMOSOMICAS}}{\text{Nº TOTAL DE CELL ANALIZADAS}} \times 100\%$$

El análisis de la interacción entre las concentraciones de tiner y los genotipos de GSTT1 y GSTM1, se realizó mediante la prueba de significancia estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$), debido a que los datos no cumplen con la asunción de normalidad; para establecer la diferencia del efecto modulador entre los genotipos GSTT1 y GSTM1, se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Para establecer el efecto combinatorio de los genes, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. La interacción de los tratamientos de tiner y el efecto modulador de la combinación de los genotipos GSTT1 y GSTM1, se logró establecer empleando la prueba de Kruskal-Wallis.

8. RESULTADOS

8.1 ENSAYOS PRELIMINARES

Para determinar el rango de concentraciones de tiner a emplear para la prueba de índice mitótico, se partió de las pruebas realizadas previamente por Hidalgo y Londoño, quienes realizaron el registro de índice mitótico y del porcentaje de viabilidad celular en cultivos de sangre total y linfocitos aislados respectivamente, determinando que el rango de concentración más adecuado para evaluar la citotoxicidad inducida *in vitro* por el tiner es de 0,025-1,200 $\mu\text{l/mL}$ [72]. Mediante ensayos preliminares para procurar el correcto funcionamiento de la prueba (2 experimentos), se determinó que el rango de concentración más adecuado para la realización de los experimentos de este estudio es 0,08-0,80 $\mu\text{l/mL}$, además de permitir la estandarización de la preparación de los extendidos metafásicos, y obtener buenas placas para el registro tanto de índice mitótico como de alteraciones cromosómicas. También se realizaron pruebas para comprobar el buen estado de los reactivos, lo que permitió además para corregir pequeños problemas en la manipulación, tales como el ajuste de la densidad celular en cada portaobjetos y mejoramiento del goteo celular para obtener extendidos más claros y fáciles de analizar.

8.2 EFECTO CITOTÓXICO

En la tabla 3 se reporta el registro del índice mitótico (IM) de linfocitos humanos de sangre total tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de tiner. Los datos del IM se ajustan a la distribución normal ($P > 0.05$) y a la homogeneidad de varianzas, por lo tanto el análisis estadístico se hizo con pruebas paramétricas. Mediante el análisis de varianza se identificó una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones ($P < 0.05$). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey, permitió establecer que los tratamientos con tiner reducen el índice mitótico de manera significativa ($P < 0.05$) respecto del control negativo (DMSO), a excepción de la concentración 0.10 $\mu\text{l/mL}$; por otro lado, las concentraciones altas de tiner (0.60 y 0.80 $\mu\text{l/mL}$) evidencian una acción drástica en la depresión del IM, siendo mayor que la reportada para el control positivo (MMC) (figura 8).

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

Concentración final de tiner (µl/mL)	IM%*						$\bar{X} \pm EE$ **
	Experimentos						
	1	2	3	4	5	6	
0.00	2.40	2.85	2.40	2.60	2.20	1.90	2.39 ± 0.13
0.08	1.60	1.50	1.90	1.75	2.30	0.80	1.64 ± 0.20 ^a
0.10	1.65	1.45	2.10	2.10	2.40	1.65	1.89 ± 0.15
0.20	1.40	1.05	1.50	1.40	1.45	1.45	1.44 ± 0.02 ^a
0.30	1.35	1.85	1.40	1.15	1.10	0.80	1.30 ± 0.14 ^a
0.40	1.30	0.60	0.60	0.60	0.85	0.50	0.74 ± 0.12 ^a
0.50	0.40	0.30	0.25	0.50	0.45	0.85	0.45 ± 0.09 ^a
0.60	0.40	0.10	0.20	0.40	0.30	0.75	0.35 ± 0.09 ^a
0.80	0.25	0.05	0.25	0.35	0.20	0.45	0.26 ± 0.05 ^a

* Promedio de dos cultivos por concentración, por experimento.

** Índice mitótico promedio ± error estándar, resultado de 6 experimentos; 2000 células analizadas por concentración en cada experimento.

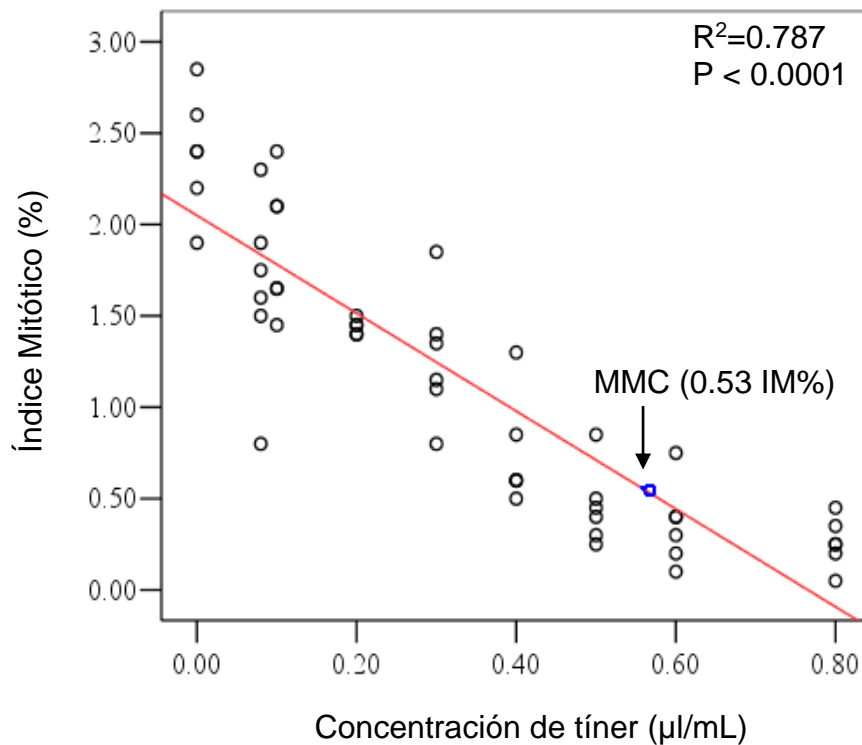
^a Tratamientos que difieren significativamente del control negativo, según prueba de Tukey (P<0.05)

Por otra parte, se identificó una asociación lineal negativa estadísticamente significativa ($R = -0.887$; $P < 0.0001$) entre las concentraciones de tiner y el IM, estableciendo una relación dosis-efecto (figura 8). Mediante el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.787$), se deduce que la variabilidad del índice mitótico depende en un 78.7% de la variabilidad en las concentraciones de tiner, el 21.3% no explicado por el modelo, se debe posiblemente a otros factores propios de estos experimentos (reactivos, manipulación, variación en T^0).

La ecuación lineal ($y = a + bx$) que describe la relación de dependencia entre el IM y la concentración de tiner:

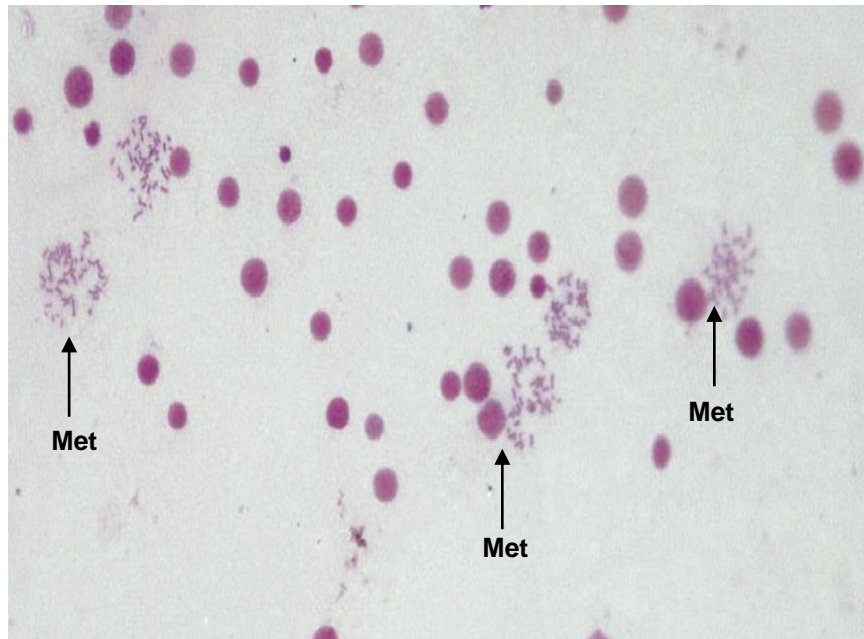
$$I.M \% = 2.050 - 2.678 \times \text{Concentración de tiner } (\mu\text{l/mL})$$

Figura 8. Asociación lineal negativa entre el I.M% de linfocitos humanos tratados *in vitro* durante 24 horas y las concentraciones de tiner.

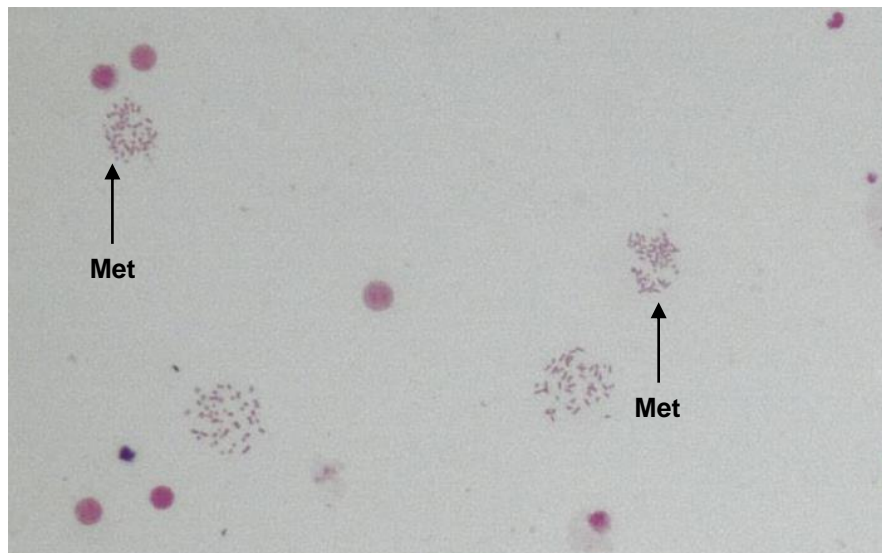


A partir de las concentraciones de tiner evaluadas *in vitro* mediante la prueba de IM, se seleccionaron tres concentraciones para determinar el efecto genotóxico mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs). La concentración que presentó un IM semejante al grupo control (DMSO) fue 0.10 µl/mL y se tomó como concentración baja, las concentraciones que disminuyeron el IM al 50% respecto del control negativo, fueron 0.30 µl/mL y 0.40 µl/mL, por lo cual se seleccionó una concentración intermedia entre estas como concentración media que fue 0.35 µl/mL y como concentración alta de tiner a 0.50 µl/mL, que disminuyó el IM a un 20% del obtenido en el grupo control negativo (DMSO) (figura 9).

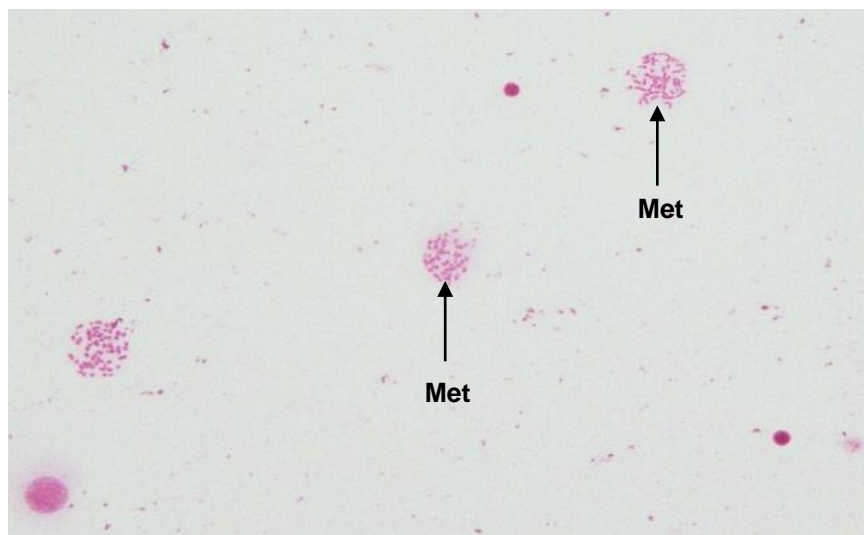
Figura 9. Metafases (Met) observadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de tiner.



Concentración 0.10 µL/mL, aumento de 10X



Concentración 0.35 µL/mL, aumento 10X



Concentración 0.50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, aumento de 10X

8.3. EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNER

La tabla 4 reporta los valores promedio de ACs /100células inducidas *in vitro* en los linfocitos humanos de sangre periférica, tratados con las concentraciones de tiner y sus controles. Debido a que los datos obtenidos no cumplen con la asunción de normalidad, se analizaron mediante prueba de significancia estadística no paramétrica con un nivel máximo de significancia de 0.05. Se identificó diferencia significativa estadísticamente ($P < 0.001$) en la frecuencia de alteraciones cromosómicas (ACs/100células) de linfocitos tratados con tiner, con respecto al control negativo (DMSO).

Mediante análisis de comparaciones múltiples T3 de Dunnet se establece que únicamente la concentración alta de tiner 0,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y el control positivo (MMC), con 0.198 ± 0.029 ACs/100células y 0.192 ± 0.020 respectivamente, incrementan la frecuencia de ACs de linfocitos, con respecto al control negativo (DMSO). En la figura 10 se puede apreciar, que la frecuencia de ACs de los linfocitos tratados con las concentraciones baja (0.10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y media (0.35 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de tiner no difieren del control negativo y son muy semejantes entre sí, no obstante se observa una asociación positiva entre los diferentes tratamientos de tiner y la frecuencia de ACs/100 células, estableciendo una relación dosis efecto.

Tabla 4. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales (ACs totales) de linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* durante 24 horas con tíner.

FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS							
(ACs/100células)							
TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	EXPERIMENTOS					$\bar{X} \pm \text{EE}^*$
		1	2	3	4	5	
DMSO	1%	0.117	0.157	0.177	0.052	0.017	0.104 \pm 0.012
BAJA	0.10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0.080	0.260	0.130	0.066	0.022	0.112 \pm 0.020
MEDIA	0.35 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0.070	0.252	0.240	0.062	0.030	0.131 \pm 0.019
ALTA	0.50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0.185	0.213	0.340	0.170	0.082	0.198 \pm 0.021 ^a
MMC	0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.250	0.205	0.240	0.180	0.087	0.192 \pm 0.020 ^a

Análisis estadístico** **P<0.001**

*Promedio de alteraciones cromosómicas totales \pm error estándar, resultado de 5 experimentos. 100 células analizadas por concentración en cada experimento.

*** Significancia estadística entre tratamientos. Prueba de Kruskal-Wallis.

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

Figura 10. Asociación lineal positiva entre la frecuencia de ACs/100células inducidas *in vitro* en linfocitos humanos de sangre periférica y las concentraciones de tíner.

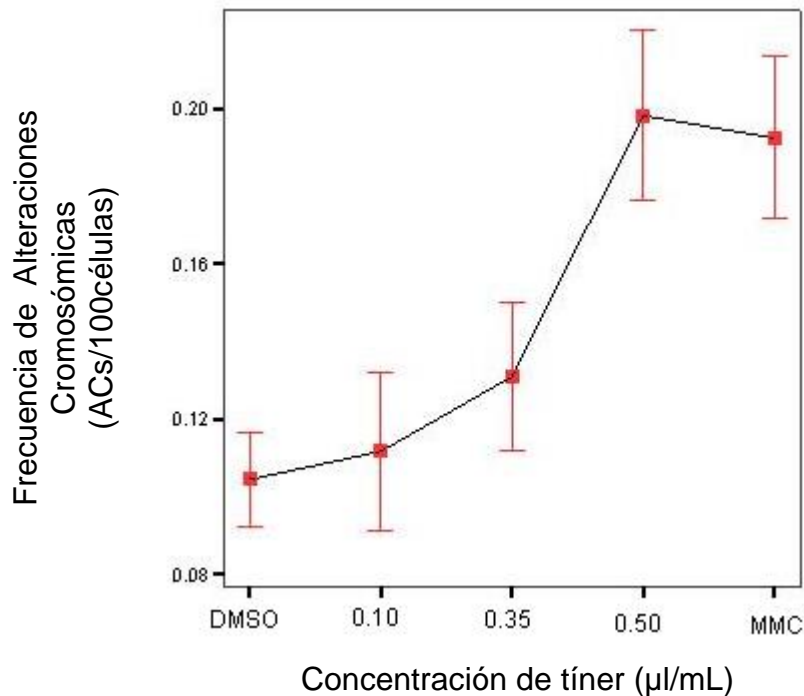
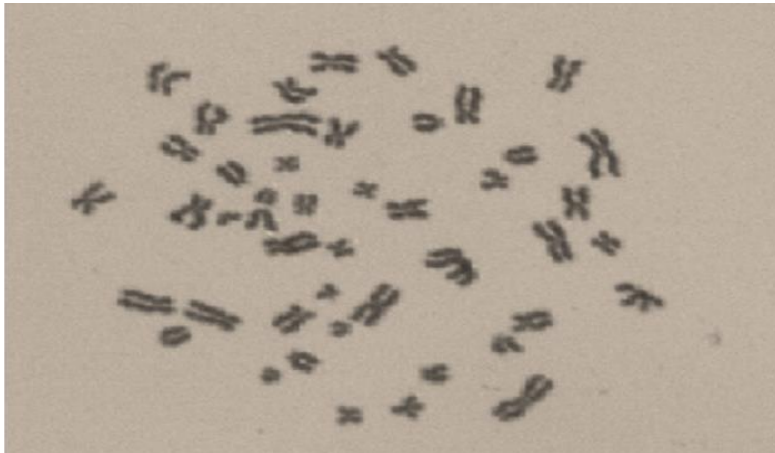
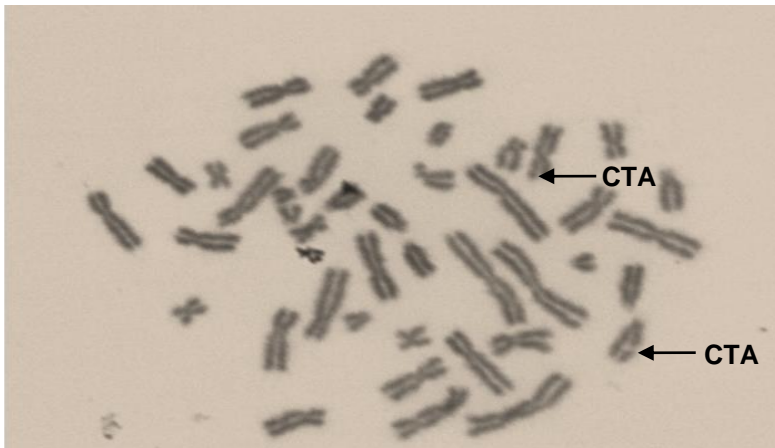


Figura 11. Alteraciones cromosómicas (ACs) encontradas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos observadas con los diferentes tratamientos de tiner (a. Metafase sin ACs y b, c y d Metafases con ACs). Quiebre cromatídico (ACT), gap cromatídico (gap ACT).

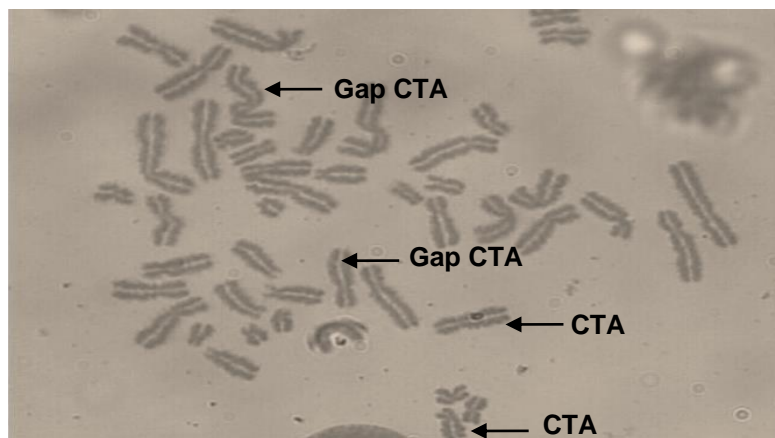
a.



b.



c.



8.4. ASOCIACIÓN ENTRE EL EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNER EN LINFOCITOS HUMANOS (*IN VITRO*) Y POLIMORFISMOS DE LOS GENES DEL METABOLISMO GSTT1 Y GSTM1

Se observó una fuerte correlación entre los genotipos GSTT1 y la frecuencia de alteraciones cromosómicas inducidas por el tiner (tabla 4); los linfocitos con genotipo GSTT1 nulo presentaron frecuencias de ACs significativamente más altas comparado con los linfocitos con genotipo GSTT1 positivo ($p < 0.0001$). Esta relación se observó para todas las concentraciones de tiner, con la mayor diferencia producida en la concentración media de tiner 0.35 $\mu\text{L/mL}$ (0.199 vs. 0.063) y además encontrando que la frecuencia de ACs tanto para el genotipo GSTT1 positivo (GSTT1 +) como para el genotipo GSTT1 nulo (GSTT1 -) fue muy semejante para la concentración alta de tiner 0.50 $\mu\text{L/mL}$ y MMC (figura 12).

TABLA 5. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales (ACs/100células) de linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con tiner, con relación a los genotipos de GSTT1.

FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs/100células)			
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{L/mL}$)	GENOTIPO	
		GSTT1+	GSTT1-
DMSO	1%	0.058 \pm 0.136	0.151 \pm 0.014 ^{a,b}
BAJA	0.10	0.056 \pm 0.013	0.167 \pm 0.034 ^{a,b}
MEDIA	0.35	0.063 \pm 0.013	0.199 \pm 0.029 ^{a,b}
ALTA	0.50	0.157 \pm 0.029 ^b	0.239 \pm 0.029 ^{a,b}
MMC	0.025 $\mu\text{g/mL}$	0.144 \pm 0.029 ^b	0.241 \pm 0.025 ^{a,b}
$\bar{X} \pm \text{EE}^*$ $P < 0.0001^d$		0.096 \pm 0.010	0.199 \pm 0.012 $P < 0.0001^c$

*Promedio de alteraciones cromosómicas totales \pm error estándar, resultado de 5 experimentos y 100 células analizadas por tratamiento/experimento.

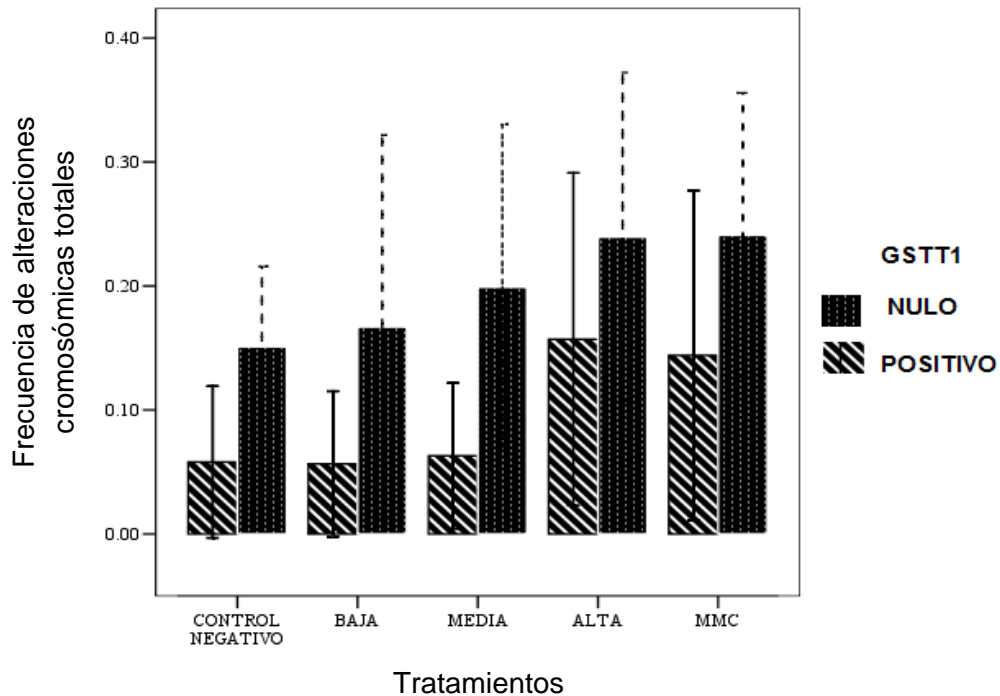
^a Valores de ACs que difieren significativamente del genotipo GSTT1+ para los diferentes tratamientos

^b Valores de ACs que difieren del grupo referente DMSO/GSTT1+. Mann-Whitney.

^c Significancia estadística entre GSTT1+ y GSTT1-, Kruskal-Wallis

^d Significancia estadística de la interacción entre tratamientos y genotipos. Kruskal-Wallis.

Figura 12. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con tiner, en función del genotipo GSTT1 (positivo y nulo)



Al establecer la interacción existente entre tratamientos y los genotipos de GSTT1, se puede observar que las frecuencias de ACs obtenidas para las concentraciones baja ($0.10 \mu\text{L}/\text{mL}$) y media ($0.35 \mu\text{L}/\text{mL}$) de tiner en relación con el genotipo GSTT1+, no difieren significativamente del grupo referente DMSO/GSTT1+. También se observa que para los linfocitos con el genotipo GSTT1- tratados con DMSO, las concentraciones $0.10 \mu\text{L}/\text{mL}$, $0.35 \mu\text{L}/\text{mL}$, $0.50 \mu\text{L}/\text{mL}$ de tiner y MMC, existe una diferencia significativamente con respecto al grupo referente DMSO/GSTT1+, esta diferencia se observa también para los linfocitos con el genotipo GSTT1+ tratados con la concentración alta de tiner $0.50 \mu\text{L}/\text{mL}$ y MMC ($p < 0.0001$), es decir que al tratar los linfocitos con la concentración alta del tiner se presenta un incremento notorio en la frecuencia de ACs, aun con el gen presente (Tabla 4).

De igual forma se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de ACs de linfocitos relacionado con el genotipo para GSTM1 (tabla 5). Los linfocitos con genotipo GSTM1 nulo presentaron frecuencias de ACs significativamente más altas comparado con los linfocitos con genotipo GSTM1 positivo ($p < 0.0001$). Observándose un comportamiento muy similar al gen GSTT1 en la frecuencia de ACs (figura 13).

TABLA 6. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales (ACs/100células) de linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con tiner, con relación a los genotipos de GSTM1.

FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs/100células)			
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	GENOTIPO	
		GSTM1+	GSTM1-
DMSO	1%	0.077 \pm 0.016	0.132 \pm 0.016 ^{a,b}
BAJA	0.10	0.094 \pm 0.033	0.129 \pm 0.023 ^{a,b}
MEDIA	0.35	0.069 \pm 0.017	0.193 \pm 0.028 ^{a,b}
ALTA	0.50	0.131 \pm 0.027 ^b	0.265 \pm 0.027 ^{a,b}
MMC	0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.184 \pm 0.025 ^b	0.201 \pm 0.034 ^{a,b}
$\bar{X} \pm \text{EE}^*$ $P < 0.0001^d$		0.111 \pm 0.011	0.184 \pm 0.012 $P < 0.0001^c$

*Promedio de alteraciones cromosómicas totales \pm error estándar, resultado de 5 experimentos y 100 células analizadas por tratamiento/experimento.

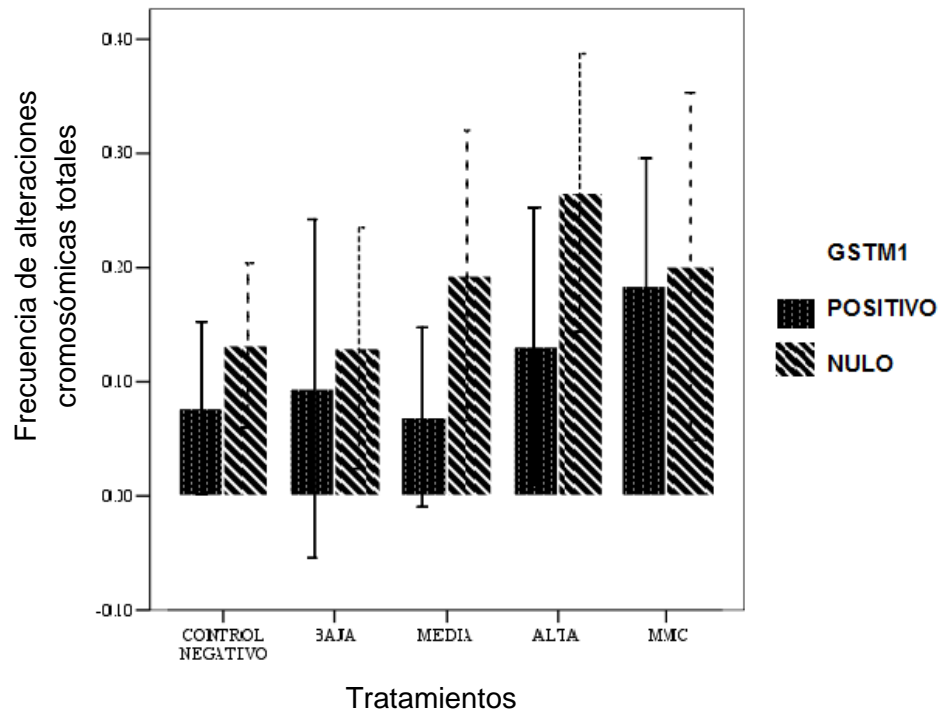
^a Valores de ACs que difieren significativamente del genotipo GSTT1+ para los diferentes tratamientos

^b Valores de ACs que difieren del grupo referente DMSO/GSTT1+. Mann-Whitney

^c Significancia estadística entre GSTT1+ y GSTT1-, Kruskal-Wallis

^d Significancia estadística de la interacción entre tratamientos y genotipos. Kruskal-Wallis.

Figura 13. Frecuencia de alteraciones cromosómicas totales en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con tiner, en función del genotipo GSTM1 (positivo y nulo).



8.5. EFECTO COMBINADO DE LOS GENES GSTT1 Y GSTM1.

Se estableció el efecto de los genes (GSTT1 y GSTM1) combinados y su efecto modulador en la inducción de alteraciones cromosómicas *in vitro* producidas por el tiner en linfocitos humanos de sangre periférica (tabla 5). Para identificar el efecto combinado entre los polimorfismos de los genes con relación a los diferentes tratamientos, se tomó como grupo referente los linfocitos tratados con DMSO y con la combinación de genotipos de GSTT1+ y GSTM1+ con una frecuencia de ACs totales de 0.016 ± 0.004 ; observando que la combinación de los genotipos GSTT1+/GSTM1+ y los diferentes tratamientos de tiner (0.10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.35 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 0.50 $\mu\text{L}/\text{mL}$), no presentan diferencia significativa respecto al grupo referente, por otra parte es importante destacar que las otras combinaciones posibles de los dos genes (GSTT1+/GSTM1-, GSTT1-/GSTM1+ y GSTT1-/GSTM1-) muestran un incremento significativo estadísticamente ($P < 0.0001$) en la frecuencia de ACs totales para los cinco tratamientos (DMSO, 0.10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.35 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 0.50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y

MMC). También resulta interesante observar que para el tratamiento con MMC y la combinación GSTM1+/GSTT1+, se presenta una frecuencia de ACs menor que la que se encuentra con el DMSO y la combinación GSTM1-/GSTM1.

Tabla 7. Efecto de la combinación de los genotipos GSTT1 y GSTM1 en la frecuencia de alteraciones cromosómicas totales inducida por el tratamiento con tiner en linfocitos humanos de sangre periférica.

FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs/100células)			
TRATAMIENTOS (μL/mL)	GENOTIPO		Alteraciones cromosómicas totales $\bar{X} \pm EE^*$
	GSTT1	GSTM1	
DMSO	+	+	0.016 \pm 0.004
	+	-	0.100 \pm 0.019 ^a
	-	+	0.138 \pm 0.018 ^a
	-	-	0.164 \pm 0.022 ^a
BAJA (0.10)	+	+	0.032 \pm 0.009
	+	-	0.081 \pm 0.022 ^a
	-	+	0.156 \pm 0.060 ^a
	-	-	0.178 \pm 0.036 ^a
MEDIA (0.35)	+	+	0.032 \pm 0.010
	+	-	0.094 \pm 0.020 ^a
	-	+	0.106 \pm 0.029 ^a
	-	-	0.292 \pm 0.028 ^a
ALTA (0.50)	+	+	0.066 \pm 0.020
	+	-	0.248 \pm 0.039 ^a
	-	+	0.196 \pm 0.042 ^a
	-	-	0.283 \pm 0.039 ^a
MMC	+	+	0.120 \pm 0.034 ^a
	+	-	0.168 \pm 0.049 ^a
	-	+	0.248 \pm 0.023 ^a
	-	-	0.234 \pm 0.047 ^a
Análisis Estadístico**			P<0.0001

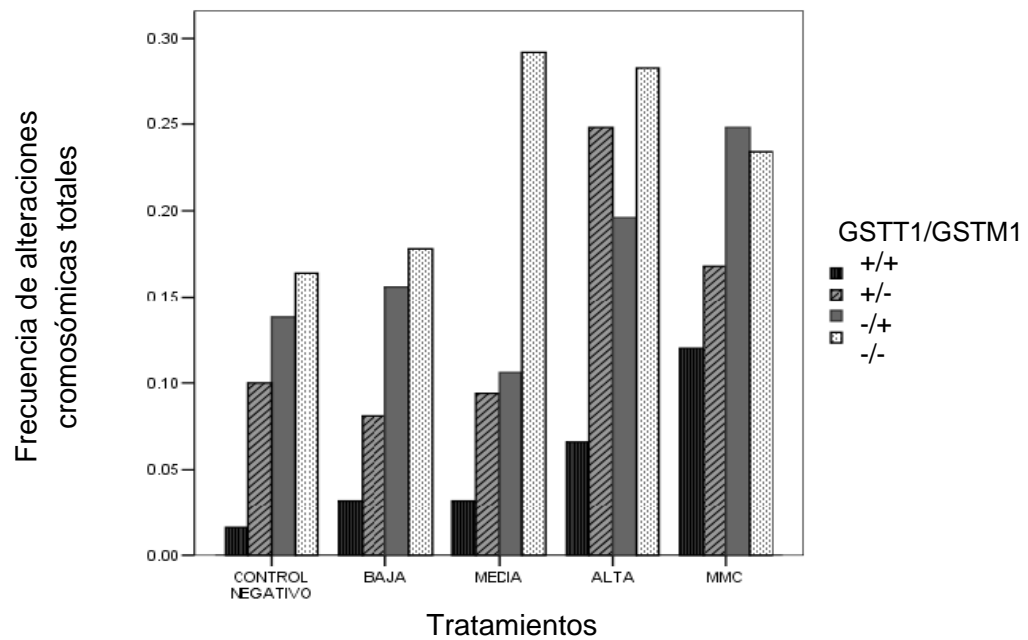
* Promedio \pm error estándar de la frecuencia de alteraciones cromosómicas totales, 2500 metafases analizadas por concentración para cada combinación de genotipo.

** Significancia estadística de la interacción entre tratamientos y la combinación de los genotipos. Prueba de Kruskal-Wallis.

^a Combinación de genotipos con valores que difieren significativamente del control negativo (DMSO) y la combinación de genotipos (GSTT1+/GSTM1+). Prueba U de Mann-Whitney.

Por otra parte, se puede observar que con el genotipo nulo para alguno de los dos genes, hasta el control negativo presenta un incremento significativo en la frecuencia de ACs (Figura 14).

Figura 14. Efecto de la combinación de los genotipos GSTT1 y GSTM1 en la frecuencia de alteraciones cromosómicas totales inducida por el tratamiento con tiner en linfocitos humanos de sangre periférica.



9. DISCUSIÓN

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado un incremento de riesgo de cáncer en personas expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos [20,120,121,124]. Además, se ha revelado el potencial genotóxico de los solventes a través de la implementación de diversos biomarcadores citogenéticos como ACs, ICHs y MNs [84,98,113-119,122]. Un estudio de biomonitorio realizado en la ciudad de Popayán con pintores de carro, revela un incremento de ACs en trabajadores expuestos comparado con el grupo control, sugiriendo que este efecto genotóxico observado es probablemente causado por la exposición a los solventes orgánicos y sugiere que el solvente más empleado en esta población es el tiner. Teniendo en cuenta lo anterior, surge la necesidad de determinar si, la exposición al tiner es la causante de genotoxicidad en los linfocitos humanos de sangre periférica, mediante la evaluación *in vitro* del tiner, con el fin de identificar su mecanismo de acción y verificar su efecto genotóxico con ayuda del biomarcador de oro, alteraciones cromosómicas (ACs), en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica.

En este estudio se empleó la experimentación *in vitro*, ya que permitió tener total control sobre diferentes variables, como las concentraciones a evaluar, el tiempo de tratamiento y a la vez eliminar factores de confusión tales como el consumo de alcohol y cigarrillo, propios de los estudios de monitoreo genético en poblaciones ocupacionalmente expuestas; permitiendo así una mayor comprensión del efecto del tiner a nivel celular. Se determinó el uso de linfocitos *in vitro* como sistema de evaluación, ya que permiten identificar compuestos con capacidad citotóxica o genotóxica y al mismo tiempo evaluar los efectos adversos de compuestos tóxicos ya conocidos para estudiar los mecanismos de acción [61].

El diseño experimental *in vitro* de este estudio, tuvo en cuenta ciertos aspectos importantes para el análisis estadístico de los datos, tales como: repetición de los experimentos para fortalecer el tamaño de la muestra, establecer cultivos duplicados por experimento, registrar 100 células por tratamiento y determinar al cultivo como la unidad experimental para el análisis estadístico. Además se decidió tener un mayor control de las diferentes variables que podrían interferir en la frecuencia de ACs inducidas por el tiner, tales como: los polimorfismos de los genes GSTT1 y GSTM1 que participan en la detoxificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y solventes orgánicos [57,59,137-140]; estableciendo 4

grupos de acuerdo a los polimorfismos en los dos genes, por lo cual, el diseño experimental de este estudio es único.

De esta forma, conociendo que la susceptibilidad por exposición a genotóxicos varía entre los individuos, por características adquiridas o heredadas, se hizo necesario en este estudio, centrar la atención en los polimorfismos de los genes que codifican para las enzimas del metabolismo de xenobióticos; ya que estos influyen en la activación metabólica y detoxificación de carcinogénicos, además de estar asociados con riesgo de cáncer y de influenciar el nivel de daño cromosómico [6]. Por lo anterior, para poder determinar si los polimorfismos en los genes GSTT1 y GSTM1 tienen algún efecto en la frecuencia de alteraciones cromosómicas inducidas por el tiner, se realizó el análisis en linfocitos obtenidos de cultivos de sangre total, ya que GSTT1 y GSTM1 se expresan en eritrocitos y linfocitos respectivamente, garantizando que ambas enzimas están presentes en el medio de cultivo y que podrían estar modulando la inducción de alteraciones cromosómicas.

Por otro lado, para el análisis citogenético se empleó la prueba de alteraciones cromosómicas, por ser un biomarcador relevante y validado a nivel mundial, que ha adquirido una importante significancia biológica como biomarcador de efecto, porque permite predecir el riesgo de cáncer. Además no solo muestra la respuesta biológica a la exposición sino también a efectos combinados por exposición y por la constitución genética de cada individuo [7,70,43,109].

9.1. EFECTO CITOTÓXICO DEL TÍNER

Esta investigación hace parte de los pocos estudios reportados aplicando un tipo de prueba citotóxica, bajo las condiciones experimentales aplicadas, que emplea linfocitos de personas saludables y aplica la prueba de índice mitótico para la evaluación del efecto citotóxico del tiner en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. En numerosos estudios el efecto citotóxico de los solventes orgánicos se relaciona directamente con el efecto carcinogénico de estos compuestos [20,83-84], por lo que estos agentes han sido clasificados por la IARC como probables carcinógenos humanos [32]. Una de las explicaciones para la citotoxicidad de los solventes se debe especialmente a su facilidad de ingresar y acumularse en el organismo en forma de radicales libres [85].

El índice mitótico (IM), es usado como indicador de proliferación celular para los estudios de genotoxicidad y se ha probado que ofrece información valiosa sobre los mecanismos de acción citotóxica de ciertos compuestos químicos *in vitro* [62,86-87]. En este estudio el IM, permitió establecer que existe una asociación directa dosis-efecto negativa entre las concentraciones de tiner y el número de metafases; esta relación es notoria en los linfocitos tratados con las diferentes concentraciones de tiner, ya que al aumentar las concentraciones disminuyó el porcentaje de células en metafase, pero el efecto fue más drástico a partir de las concentraciones de 0.40 $\mu\text{l}/\text{mL}$ ($\text{IM}=0.74 \pm 0.12$), 0.50 $\mu\text{l}/\text{mL}$ ($\text{IM}=0.45 \pm 0.09$), 0.60 $\mu\text{l}/\text{mL}$ ($\text{IM}=0.35 \pm 0.09$) y 0.80 ($\text{IM}=0.26 \pm 0.05$) comparado con el IM obtenido en los linfocitos tratados con el control negativo ($\text{IM}=2.39 \pm 0.13$). La disminución drástica del IM refleja una inhibición del progreso del ciclo celular y/o pérdida de la capacidad proliferativa, fenómeno posiblemente causado por muerte celular o apoptosis [62,88], este mecanismo de equilibrio celular esta implicado en la respuesta celular a la exposición de una gran variedad de tóxicos [89].

En un estudio reciente, se evaluó el efecto citotóxico del tiner en linfocitos humanos aislados tratados *in vitro* durante 24 horas, mostrando una disminución significativa del índice mitótico y de la viabilidad celular, indicando además por marcaje de las células con el kit de anexina V – FITC y análisis morfológicos mediante citometría de flujo, que esa disminución de la viabilidad celular y del número de células en mitosis se debe al incremento de la muerte celular (apoptótica y necrótica) y que este depende de la concentración y del tiempo de tratamiento de los linfocitos con tiner, fenómeno posiblemente causado por un aumento de las especies reactivas de oxígeno formadas por los diferentes químicos presentes en esta mezcla compleja, asociando a esta mezcla de solventes como inductores de daño citotóxico (reducción del índice mitótico y de la viabilidad celular) y muerte celular apoptótica de linfocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de tiner [88]. Reafirma lo anterior, los resultados obtenidos en otro estudio, empleando linfocitos de sangre total, donde se evidenció una disminución de la viabilidad celular dosis-dependiente de los linfocitos humanos tratados *in vitro* durante 4 horas a concentraciones de tiner incrementadas, mediante la prueba de exclusión celular con azul de tripano [72].

El efecto citotóxico del tiner podría estar mediado por un efecto sinérgico de los componentes activos de este solvente, que incluyen tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, hexano, 2,3-dimetilhexano, nonano, isobutano, octano y etilbenceno entre otros [78]. Lo anterior, es soportado por un estudio realizado en líneas celulares humanas normales expuestas a benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, donde se encontró un efecto sinérgico al evaluar los solventes orgánicos de manera individual y como mezcla compleja, debido a que se presentó una alta citotoxicidad celular [93]. Otro estudio realizado por McDermott y colaboradores,

evaluando la exposición al tolueno y n-hexano de manera individual y como mezcla binaria, en líneas celulares Jurkat T, concluye que la mezcla de solventes orgánicos es más tóxica aun a bajas concentraciones por su efecto sinérgico [94].

9.2. EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNER

Los resultados de esta investigación muestran que existe una relación positiva concentración-efecto entre los tratamientos del tiner y la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales (ACs), evidenciando el efecto genotóxico del tiner *in vitro* en linfocitos humanos; aunque algunos de los solventes que conforman el tiner no son considerados como genotóxicos o carcinogénicos de manera individual, probablemente inducen simultáneamente un efecto genotóxico por una interacción de carácter sinérgico entre estos [95]. En algunos estudios se ha encontrado que la exposición a hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, está relacionada con el aumento del estrés oxidativo, revelando así, que el aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) esta directamente asociado con la exposición a solventes orgánicos [101] y además, se conoce que el estrés oxidativo está fuertemente involucrado en la etiología de numerosas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer [100]. Por otra parte, estudios *in vitro* reportan que las ROS son capaces de inducir daño oxidativo severo en el DNA, y la incorrecta reparación de este daño puede expresarse como alteraciones cromosómicas ACs, intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos (MN) [77].

De igual forma se ha demostrado la relación existente entre la generación de ROS por los metabolitos del benceno, uno de los componentes principales del tiner, con su citotoxicidad y genotoxicidad, encontrando además, que estos metabolitos generan peróxidos intracelulares, principalmente H_2O_2 , causando rupturas en la cadena de DNA [102-103-104]. También se ha reportado la producción de radicales hidroxilo en medula ósea de ratones [105] por parte del benceno, y que altas concentraciones de tolueno incrementan la formación de ROS en hígado, pulmón, riñón y cerebro en ratas [106-107- 108], además de los efectos *in vitro* del tolueno y sus derivados metilados m-, o-, y p-xileno en la generación de ROS, peroxidación lipídica [108-109-110] y defectos en la estructura de la mitocondria [111]. Lo anterior permite soportar la hipótesis de que el daño genotóxico inducido por el tiner está mediado por un efecto sinérgico de sus componentes principales y que el incremento del daño en el DNA a medida que aumenta la concentración de este solvente orgánico, podría presentarse como consecuencia de daño oxidativo en material genético por interacción con ROS.

Es importante tener en cuenta que el tipo de ACs que puede producir un agente químico depende básicamente de la etapa del ciclo celular en la que se encuentran los linfocitos durante la exposición. En este estudio, dicho efecto dañino se expresa en forma de alteraciones cromatídicas (ACTs), lo cual es el producto de lesiones iniciales no reparadas (alteraciones de bases, entrecruzamientos, dímeros de pirimidina, o quiebres de cadena sencilla, dependiendo del agente inductor) [66,96]; asumiendo entonces que esta mezcla compleja de solventes orgánicos presenta una actividad fase S- dependiente [97]. Esto es soportado por Hidalgo y Londoño (72), quienes mediante la aplicación del ensayo cometa alcalino, detectaron un incremento altamente significativo de daño en el DNA (parámetros de momento de cola y porcentaje de DNA en la cola) de linfocitos tratados con diferentes concentraciones de tiner, lo que revela el efecto directo de este solvente orgánico al interactuar con el material genético de los linfocitos, generando lesiones primarias como quiebres de cadena sencilla, que al no ser reparados eficientemente y mediante el proceso de replicación del DNA son expresados como quiebres de doble cadena y darán lugar a la formación de alteraciones cromosómicas de tipo cromatídico [66].

Recientemente, se han examinado una variedad de biomarcadores para evaluar la exposición humana a las mezclas complejas, en regiones de alta polución en Polonia, sugieren que la exposición está asociada con aumentos significativos en aductos en el DNA por los carcinógenos (hidrocarburos aromáticos policíclicos y otro aductos aromáticos), y un aumento de la frecuencia de ICHs, ACs y la expresión de oncogenes [84]. Una revisión reciente Zhang *et al.*, [112], llegó a la conclusión de que la mayoría de los estudios de genotoxicidad donde se evaluó la exposición a los derivados del benceno presentan una asociación positiva entre ACs y la exposición, [113-114] y es posible que esta correlación sea causada por otros factores de exposición (HAPs y/o la polución ambiental) [115]. Por otra parte se conoce que hay una alta incidencia de ACs, MNs e ICHs en linfocitos de obreros expuestos a tolueno en industria de tintas para impresoras [116- 119].

En un número amplio de estudios epidemiológicos se establece que el riesgo de cáncer se potencializa con los procesamientos de pinturas [120] y se reporta un aumento significativo en los diferentes tipos de cáncer del tracto respiratorio, riñón, vejiga y leucemia en tipógrafos [121]. En estudios de biomonitorio en poblaciones humanas expuestas ocupacionalmente a niveles altos de mezclas complejas de solventes y contaminantes del aire, se revela riesgo genotóxico [122], y un aumento en la incidencia de daño cromosómico [123]. Hoy en día, el benceno recibe un principal interés y se centra en la continua y prolongada exposición a bajos niveles de este solvente, tanto en el trabajo como en el ambiente en general [124]. Varios estudios mostraron, que muchos de los metabolitos producidos por este compuesto favorecen la toxicidad, generando

ROS que puede llevar al daño oxidativo y quiebres de cadena en el DNA [125]. En otras investigaciones con un modelo cuaternario predictivo (PBPk) realizados en animales se estableció, que un aumento en la concentración de algunos de los solventes, mostró un efecto aditivo, potencializando la toxicidad entre el benceno, tolueno y/o xileno [126].

9.3. ASOCIACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL TÍNER EN LINFOCITOS HUMANOS (*IN VITRO*) Y EL EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO GSTT1 Y GSTM1

9.3.1. Asociación del efecto genotóxico y los polimorfismos del gen GSTT1.

Se observó una variación pronunciada en la frecuencia de ACs, dependiente de los polimorfismos del gen GSTT1, sugiriendo que los polimorfismos en este gen podrían modular la frecuencia de ACs tras el tratamiento con diferentes concentraciones de tiner en cultivos de sangre total. Aunque la actividad de la enzima GSTT1 se exprese en los eritrocitos, se espera que en cultivos de sangre total este presente la actividad enzimática [6,143]. Estos resultados son soportados por diversos estudios en cultivos de sangre total, donde se ha descrito que el nivel basal de ICHs y ACs es alto en donadores con GSTT1 nulo, en comparación a los individuos con el genotipo positivo [136]. Un ejemplo claro, son los estudios *in vitro* realizados en linfocitos de sangre periférica humana, con genotipo nulo para GSTT1, donde se muestra claramente una diferencia interindividual en la susceptibilidad frente al efecto genotóxico a HAPs, hidroquinona (toxina resultante del metabolismo del benceno), Diepoxibutano (DEB), 1,3- butadieno y estireno [57,59,137-138-139-140]. Uuskula *et al.*, [141] investigaron la inducción de ICHs en linfocitos humanos por la exposición al óxido -7,8 –estireno con el polimorfismo de GSTT1, que reveló un incremento significativo estadísticamente de ICHs en los linfocitos de sangre total [137--142]. De igual forma, se ha reportado que la enzima GSTT1 modula la inducción de ICHs por monoepoxibutano (MEB) en cultivos de sangre total [143].

Obteniendo una diferencia significativa entre los genotipos positivo y nulo donde se resalta, que los linfocitos con el genotipo GSTT1nulo (GSTT1-) presenta una frecuencia de ACs totales 2 veces mayor que la registrada en linfocitos con el GSTT1positivo (GSTT1+). Con relación a la interacción entre los tratamientos de tiner y los polimorfismos del gen, se puede inferir que los linfocitos con GSTT1- son más susceptibles a la inducción de ACs por la exposición a las diferentes concentraciones de tiner (baja, media y alta), y por otro lado encontramos que los linfocitos con el genotipo GSTT1+ es susceptible solo a la concentración alta de tiner (0.5 µL/mL).

Vale la pena resaltar que el tratamiento *in vitro* de linfocitos humanos de sangre total presenta un efecto en la frecuencia de ACs, demostrando una interacción con los genotipos positivo y nulo para el GSTT1, sugiriendo que la enzima codificada con este gen está involucrada en la detoxificación metabólica del tiner y de solventes orgánicos. Teniendo en cuenta que los linfocitos con GSTT1nulo presentaron una mayor susceptibilidad al daño genético inducido por el tiner en las condiciones dadas en este estudio, lo que permite alertar a las personas que se encuentran continuamente expuestas a este tipo de solventes orgánicos, sobre los efectos adversos en la salud de este tipo de sustancias químicas.

Los resultados obtenidos en este estudio, son soportados por uno realizado en diferentes poblaciones, revelando que el genotipo nulo de GSTT1 es un factor significativo de riesgo en la inducción de ICHs entre los obreros expuestos al benceno, sugiriendo así que la GSTT1 está involucrada en la detoxificación del benceno y que esta delección incrementa el riesgo de genotoxicidad por el benceno en los individuos [153]. La falta de la enzima GSTT1, se relaciona con un ligero aumento del riesgo de cáncer de vejiga, tracto gastro-intestinal (faringe), tumores relacionados con el tabaco (pulmón, cabeza, cuello) [121,115,154]. cáncer de pulmón, sugiriendo que los individuos con este genotipo nulo pueden ser genéticamente predispuestos a un mayor riesgo de desarrollar cáncer [151-155]. De este modo, se sospecha que el genotipo GSTT1 está involucrado en la disminución o el aumento de riesgo de cáncer en relación con la fuente de exposición [121].

9.3.2. Asociación del efecto genotóxico y los polimorfismos del gen GSTM1.

Los resultados de este estudio, mostraron una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre los genotipos positivo y nulo, donde se resalta, que el genotipo GSTM1nulo (GSTT1-) presenta una frecuencia de ACs totales 1.6 veces mayor que la registrada en los linfocitos con el GSTM1positivo (GSTT1+), se estableció que los linfocitos con GSTM1- no presentan diferencia significativa respecto a la concentración baja de tiner ($0.1 \mu\text{L/mL}$), no obstante si presenta mayor susceptibilidad en la inducción ACs por la exposición a las concentraciones media y alta de este solvente, y por otro lado encontramos que el genotipo GSTM1+ es susceptible solo para la concentración alta de tiner; observando que el polimorfismo del gen GSTM1, está asociado con la susceptibilidad a daño del material genético inducido por el tiner, sugiriendo que GSTM1 presenta una alta afinidad por las moléculas genotóxicas formadas a través del metabolismo de los solventes orgánicos que conforman el tiner.

Es importante resaltar que el tratamiento *in vitro* de linfocitos humanos de sangre total presenta un efecto en la frecuencia de ACs, demostrando una interacción con los genotipos positivo y nulo para el GSTM1, sugiriendo que la enzima codificada con este gen está involucrada en la detoxificación metabólica del tóxico y de solventes orgánicos. Teniendo en cuenta que los linfocitos con GSTM1nulo presentaron una mayor susceptibilidad al daño genético inducido por el tóxico en las condiciones dadas en este estudio, lo que permite alertar a las personas que se encuentran continuamente expuestas a este tipo de solventes orgánicos, sobre los efectos adversos en la salud de este tipo de sustancias químicas.

Lo anterior es soportado por estudios donde se sugiere que, el gen GSTM1 está involucrado en la detoxificación de los carcinógenos intermedios de HAPs. Este hallazgo apoya la hipótesis activa de que los HAPs y los solventes orgánicos podrían estar involucrados con el riesgo de cáncer urotelial [142]. Uuskula *et al.*, [141] sugiere que el genotipo GSTM1 no influyó en la inducción de ICHs en los linfocitos humano expuestos *in vitro* al óxido-7,8-estireno [142]. En estudios previos, el polimorfismo GSTM1 no presenta asociación significativa en la variación de las frecuencias de ACs, ICHs o MNs en personas expuestas y controles [22], Sasiadek, *et al.*, [156] sostiene que existe un aumento en la sensibilidad a la inducción de ICHs por el monoepoxibutano (MEB) en donadores con GSTM1 nulo, indicando que GSTM1 esta involucrada en la detoxificación de MEB en cultivos de linfocitos humanos.

En estudios recientes, se ha observado un aumento en el riesgo de cáncer entre los fumadores con GSTM1 nulo [158, 45], estimado que el 17% de los casos es de cáncer de pulmón [158] y laringe [41]; resultados de otras investigaciones indican que trabajadores expuestos a HAPs con GSTM1 nulo, presentan un incremento en el riesgo de adquirir cáncer de vejiga [161-162-163]. A pesar de que estos valores sólo proporcionan una medida cruda de la población potencial, el impacto de estos genes, sugieren que la deficiencia de GSTM1 podría contribuir a una importante incidencia de cáncer en la población. Roodi, *et al.*, observó que el genotipo GSTM1 nulo fue elevado significativamente en el grupo de pacientes con cáncer ovárico, en relación con el grupo control (59.0% vs 48.9%) y sugiere que los focos endometriales en mujeres con este genotipo pueden presentar transformación maligna debido a la ineficiencia en el control del estrés oxidativo [164-165]. De este modo, se sospecha que el genotipo GSTM1 está involucrado en la disminución o el aumento de riesgo de cáncer en relación con la fuente de exposición [121].

9.3.3. Efecto combinado de los genes GSTT1 y GSTM1. El efecto genotóxico del tiner, provoca un mayor daño al material genético en los linfocitos expuestos, que presentan las diferentes combinaciones genotípicas GSTT1-/GSTM1-, GSTT1-/GSTM1+, GSTT1+/GSTM1-, presentándose en este orden el decrecimiento de las frecuencias de ACs; estableciendo, además, que la combinación con menor frecuencia de ACs y que favorece a la detoxificación de estos solventes es el genotipo GSTT1+/GSTM1+. Nuestros datos indican que la variabilidad alélica de los genes GSTT1 y GSTM1 esta involucrada en la detoxificación de los solventes orgánicos, modulando el efecto genotóxico del tiner en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica.

Esto es claro, ya que el genotipo nulo para ambos genes mostró un incremento drástico en la frecuencia de ACs en los linfocitos tratados con las concentraciones media y alta de este solvente, seguido por la combinación GSTT1-/GSTM1+, que muestra un mayor efecto al exponer los linfocitos a concentraciones baja y alta de tiner, mientras que los linfocitos con GSTT1+/GSTM1-, muestran un incremento significativo en la frecuencia de ACs en los linfocitos tratados con la concentración alta de tiner. Estos resultados son soportados por dos estudios se muestra un aumento en los indicadores biológicos (MN y ACs) reportando la influencia del genotipo, respecto a los genes involucrados en la detoxificación de xenobióticos como GSTT1 y GSTM1 [95]. Las asociaciones entre los genotipos de GSTs y enfermedades puede reflejar un eslabón entre el daño citogenético y la variabilidad alélica específicas en los genes. Así, las células con GSTT1 y GSTM1 nulo son más susceptibles a ICHs por la exposición a varios compuestos electrofílicos [166].

De acuerdo a los resultados arrojados en varias investigaciones, se sabe que la respuesta biológica al tratamiento químico, depende del genotipo [135]. Además, de influenciar el riesgo de cáncer, algunos polimorfismos genéticos en las enzimas del metabolismo de xenobióticos, también influyen en los biomarcadores de exposición (aductos) y biomarcadores tempranos de efecto (ACs) a la exposición de compuestos carcinógenos [3], por lo que es importante resaltar el papel de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1, que consiste en determinar la susceptibilidad individual a químicos que inducen daño citogenético y genotóxico [52]. También se ha establecido la influencia del genotipo nulo, indicando variaciones en la respuesta de la población expuesta, este genotipo puede probablemente resaltar el efecto de la exposición [125]. Es por esto, que el metabolismo de hidrocarburos volátiles, incluyendo los solventes orgánicos, está recibiendo una creciente atención, por la activación y detoxificación metabólica de estos solventes durante el proceso de biotransformación [39].

Se conoce que la susceptibilidad a la acción genotóxica de los diferentes solventes orgánicos, puede estar asociada a factores de riesgo genético o adquirido de los individuos, y puede asociarse con las diferencias en el proceso del metabolismo de xenobióticos [47,127]. Es de suponerse que una dosis igual de un carcinógeno, a una persona con disminución en la habilidad de detoxificar ese agente toxico debe estar en un mayor riesgo de desarrollar cáncer, que un individuo que eficazmente detoxifica el agente carcinogénico [71]. La capacidad de detoxificar esta relacionada con la distribución de los polimorfismos de los genes que codifican para las enzimas metabolizadoras de xenobióticos [3].

Diferentes estudios indican que muchos sistemas de control y modulación del metabolismo enzimático de xenobióticos, parecen estar implicados en la génesis de los diferentes tipos de cáncer [43,130], conociéndose que GSTT1/GSTM1 son responsables de la detoxificación de los solventes orgánicos [131-132], debido a que estas enzimas participan en la conjugación del glutatión (GSH) con compuestos electrofílicos. Debido a la acción detoxificante, se ha sugerido que estas enzimas desempeñan un papel importante en la susceptibilidad al cáncer [43,121,133,134,175]. En conjunto, el papel de los polimorfismos en los genes de GST, determinan la susceptibilidad al cáncer de pulmón, vejiga, cabeza, cuello [150] y colorectal [159-167-168]. Estos resultados sugieren que las GST modifican el nivel de susceptibilidad al cáncer. Howells *et al.*, encuentran en 148 mujeres con cáncer ovárico, que la combinación de GSTT1 nulo y GSTM1 nulo esta asociado con una tasa de supervivencia muy baja [169].

Otro dato de consideración, es la validez del Dimetilsulfoxido (DMSO) como Control negativo, el cual al evaluar el efecto genotóxico del tiner en los cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre total, muestra que actúa como un buen control negativo, pero al analizar la interacción del efecto de los diferentes tratamientos (DMSO, Concentraciones de tiner y MMC) con el efecto modulador de los polimorfismos de los genes GSTT1 y GSTM1 individualmente o combinados, se observa claramente que el DMSO presentó un efecto genotóxico en los linfocitos que presentaban algún genotipo nulo, por lo que se sugiere que, los ensayos *in vitro* que relacionan los biomarcadores de efecto y de susceptibilidad presentan una mayor sensibilidad al efecto genotóxico de algunas sustancias, efecto que no es detectable sin tener en cuenta la los biomarcadores de susceptibilidad.

Estos resultados sugieren que las enzimas codificadas por los genes GSTT1 y GSTM1 están involucradas en la detoxificación metabólica de mezclas complejas de solventes orgánicos como el tiner; teniendo en cuenta que los linfocitos con

GSTT1nulo y GSTM1nulo presentaron una mayor susceptibilidad al daño genético inducido por el tiner en las condiciones dadas en este estudio, lo que permite alertar a las personas que se encuentran continuamente expuestas a este tipo de solventes orgánicos, sobre los efectos adversos en la salud de este tipo de sustancias químicas. Lo anterior sugiere que, las GSTs hacen parte integral de un mecanismo de defensa dinámico e interactivo de protección contra los diferentes agentes electrofílicos y permiten modular la respuesta a la exposición de productos del estrés oxidativo, y de este modo, se sospecha que los genotipos GSTT1 y GSTM1 permite la disminución o el aumento de riesgo de cáncer en relación con la fuente de exposición.

10. CONCLUSIONES

Se presentó una disminución en el índice mitótico (IM), mostrando que el tiner tiene un efecto citotóxico en los cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica, probablemente como consecuencia de la inhibición del progreso del ciclo celular y/o la pérdida de la capacidad proliferativa, fenómeno posiblemente causado por muerte celular o apoptosis.

El efecto genotóxico del tiner se evidenció con las tres concentraciones evaluadas en linfocitos humanos, las cuales indujeron alteraciones cromosómicas estructurales, mostrando que la mayoría de las alteraciones detectadas con los diferentes tratamientos, fueron de tipo cromatídico (ACTs), lo cual explica que el tiner presenta una actividad fase S-dependiente. Además cabe resaltar que la prueba de alteraciones cromosómicas estructurales, no solo muestran la respuesta biológica a la exposición sino también a efectos combinados por exposición y por la constitución genética.

La exposición *in vitro* de los linfocitos humanos al tiner presentó un efecto directo en la frecuencia de ACs y muestra una interacción con los genotipos de la GSTs, sugiriendo que las enzimas codificadas por los genes GSTT1 y GSTM1, podrían estar involucradas en la detoxificación metabólica de los solventes presentes en esta mezcla compleja.

Los resultados de este estudio sugieren que los genes GSTT1 y GSTM1 modulan el efecto genotóxico del tiner en los linfocitos humanos. Los linfocitos con GSTT1 y GSTM1 nulos presentaron una mayor frecuencia de ACs, demostrando que la presencia de esta combinación de genotipos representa un alto riesgo genotóxico y por ende, podría estar relacionado con el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

11. IMPACTO

A nivel ocupacional, encontramos que el tiner es el solvente orgánico de composición mixta de mayor demanda en la ciudad de Popayán, por los trabajadores independientes del comercio informal, pintores de carros y la comunidad en general, esto debido a su gran utilidad en la preparación y dilución de pinturas, y por su bajo precio. Al divulgar los resultados de esta investigación se busca alertar a la comunidad sobre los efectos adversos por el uso continuo e inadecuado de esta mezcla compleja de solventes orgánicos; además incrementar la atención de las entidades prestadoras de salud (ARS y EPS) y entidades gubernamentales en el desarrollo de estrategias de control, regulación y protección de la salud de los trabajadores del sector informal.

Estudios como este, contribuirán al conocimiento del efecto genotóxico del tiner y el riesgo de desarrollar problemas de salud como el cáncer, lo cual motivará al autocuidado y al desarrollo a mediano y largo plazo de una cultura hacia la prevención del problema de salud y en consecuencia una mejor calidad de vida.

Este estudio contribuirá al conocimiento científico sobre la importancia del desarrollo de ensayos *in vitro* que relacionan los biomarcadores de efecto y de susceptibilidad, ya que este tipo de experimentación presentan una mayor sensibilidad frente al efecto genotóxico de algunas sustancias, efecto que muchas veces no es detectable sin tener en cuenta la los biomarcadores de susceptibilidad.

12. SUGERENCIAS

Se conoce que la gran mayoría de la población Colombiana se encuentra en riesgo por la exposición a los diferentes agentes tóxicos que existen en el ambiente, por lo que resulta pertinente la realización de estudios de biomonitoreo ocupacional para identificar los individuos y poblaciones más susceptibles y en mayor riesgo de desarrollar problemas de salud por la exposición ocupacional a agentes genotóxicos como los solventes orgánicos.

El riesgo en los problemas de salud está asociado a las interacciones gen-ambiente y gen-gen, por lo que se hace necesario seguir evaluando los genes que participan en el metabolismo de xenobióticos, reparación del ADN, control del ciclo celular y entre otros procesos biológicos, para entender el papel que desempeñan los factores genéticos en la determinación de la susceptibilidad individual y el desarrollo de problemas de salud.

Se recomienda realizar más estudios *in vitro* donde se implementen los biomarcadores de efecto y de susceptibilidad, ya que este tipo de experimentación presentan una mayor sensibilidad frente al efecto genotóxico de algunas sustancias, efecto que muchas veces no es detectable sin tener en cuenta los biomarcadores de susceptibilidad como lo son los genes de la GSTs.

BIBLIOGRAFÍA

1. NIÑO, R., CAMARGO, J. Caracterización del thinner por la industria de pinturas de uso domestico en Santafé de Bogotá D.C. por cromatografía de gases. Trabajo de grado (Químico farmacéutico). En : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Área farmacia. Santafé de Bogotá, (1999). p. 35.
2. GREIM, H., and SNYDER, R. Toxicology. An introduction for medical and natural science students. En : Division of Environmental Dermatology and Allergology Center for Allergy and Environment Technical University Munich (GSF/TUM, ZAUM.) Version 20-1-(2006).
3. AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing encimes as susceptibility factors in toxic response. En : Mutation Research. Vol. 464. (2000). p. 65-76.
4. NORPPA H., et al., Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticida-exposed greenhouse workers. Mutation research. Vol. 389. (1997). p. 227-235.
5. MERRILL, C. *et al.*, Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. En : Toxicology Letters. Vol. 120. (2001). p. 269–280.
6. NORPPA H. Cytogenetic biomarker and genetic polymorphisms. En : Toxicology Letters. Vol. 149. (2004). p. 309-334.
7. HAGMAR L. *et al.*, Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). En : Cancer Research. Vol. 58. (1998). p.4117–4121.
8. MENDOZA, A. *et al.*, Occupational Toluene Exposure Induces Cytochrome P450 2E1 mRNA Expression in Peripheral Lymphocytes. En : Environmental health perspectives. Vol. 114. No 4. (abril 2006).
9. AU, W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. Vol. 6. No 4. (1991).

10. SEEDORTT, L. y OLSEN, E. Exposure to organics solvents: a survey on the use solvents. En : Ann Occup. Hyg. Vol. 34. (1990). p. 371-8.
11. IARC, (International Agency for Research on Cancer). 1985. Citado por: RAPPAPORT, S. Biological considerations in assessing exposures to genotoxic and carcinogenic agents. En : Int Arch Occup Environ Health. Vol. 65. (1993). p. 529-535.
12. RAPPAPORT, S. Biological considerations in assessing exposures to genotoxic and carcinogenic agents. En : Int Arch Occup Environ Health. Vol. 65. (1993). p. 529-535.
13. CARVAJAL CARRASCAL, Gloria. *et al.*, Exposición ocupacional a solventes orgánicos y alteraciones en la visión del color en trabajadores de una empresa de hidrocarburos. En : Actual. Enferm. Vol. 7. No 2. (2004). p.7-10.
14. CROUTE, F. Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP90 and GRP78 STRESS PROTEINS in cultured human cells. En : Biochimica et biophysica Acta. Vol. 159. No. 1-3. (aug 19- 2002). p. 147-155.
15. QUIÑÓNEZ, L. *et al.*, Cancer pharmacogenetics: Study of genetically determined variations on cancer susceptibility due to xenobiotic exposure. En : Rev. Méd. Chile. Vol. 134. (2006). p. 499-515.
16. HOYOS, L. Susceptibilidad genética-adquirida y riesgo de cáncer. Universidad del Cauca. (Febrero 2004).
17. INIESTA, R. GUINO, E. y MORENO, V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. En : Gaceta Sanitaria. Vol. 19. No. 4. (2005). p. 333-341.
18. NORPPA H., and HIRVONEN, A. Metabolic polymorphisms of importance in biomonitoring. En : Life Sciences. Vol. 313. (2000). p. 289-299. Citado por: NORPPA, H. Cytogenetic biomarker and genetic polymorphisms. En : Toxicology Letters. Vol. 149. (2004). p. 309-334.
19. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Toxicological Review of Toluene. En : In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). No. 108-88-3. (September 2005). P .4-31.

20. IARC International Agency for Research on Cancer. Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. Lyon. En : IARC monographs on the evaluation of carcino-genic risks to humans. Vol. 47. (1989). p.79-156. Citado por: Cancer incidence among Finnish workers exposed to aromatic hydrocarbons. En : Int Arch Occup Environ Health. Vol. 71. (1998). p. 187-93.
21. NORPPA H., *et al.*, Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in detennining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. En : Carcinogenesis. Vol. 16. (1995). p.1261–1264.
22. STRANGE, R. C., JONES, P.W. and FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. En : Toxicology Letters. Vol. 112–113. (2000). p. 357–363.
23. WOLF, C. R. Identification of the primary gene defect at the cytochrome *P*₄₅₀*CYP2D* locus. En : Nature. Vol. 347. (25 October 1990). p.773 – 776.
24. The National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). ENVIRONMENTAL GENOME PROJECT (online) in 1997. [cited 15 de octubre de 2006] <http://www.niehs.nih.gov/envgenom/home.htm>
25. NORPPA, *et al.*, Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. En : Mutation Research xxx (2006) xxx–xxx.
26. CONFORTI, N. *et al.*, Predisposing genes and incresed chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. En : Mutation Research. Vol. 82. No.17. (1997). p. 1-7.
27. HAGMAR, L. *et al.*, Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. En : Cancer Research. Vol. 54. (1994). p. 2919–2922.
28. HOYOS, L., CARVAJAL, S., CAJAS, N. Manual de citogenética: linfocitos humanos. Universidad del Cauca. Popayán. (2002).
29. INTERNATIONAL LABOR OFFICE. Industrial Solvents. In Parmeggiani L. (ed). Encyclopedia of Occupational Health and Safety. INTERNATIONAL LABOR OFFICE, Geneva, Switzerland, (1994). p. 2085-2088. Citado por: SCHENKER, M., JACOBS, J.A. Review article. Respiratory effects of

- organic solvent exposure. En : Tubercle and Lung Disease. Vol. 77 (1996); p. 4-18
30. SCHENKER, M., JACOBS, J.A. Review article. Respiratory effects of organic solvent exposure. En : Tubercle and Lung Disease. Vol. 77 (1996); p. 4-18
31. COSKUN, O., *et al.* The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. En: Neurochem. Res. Vol. 30 (2005); p. 33–38.
32. IARC. Some industrial chemicals, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. En : Internacional Agency for Research on Cancer. Lyon. Vol. 60. (1994).
33. IKEDA, M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. En : Toxicology Letters. Vol. 77. (1995). p. 85-91.
34. HOLMBERG B., HOGBERG J. AND JOHANSON G. Principios generales de la toxicología. En : Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Cap. 33. p. 3-16. (1998).
35. PADRÓN, H. *et al.*, Evaluación de la exposición ocupacional a solventes en trabajadores de una fabrica de calzado. En: Rev, Cubana Hig. epidemiology. Vol. 37. No 3. (1999). p.114-121.
36. NAKAJIMA, T y AOYAMA, T. Polymorphism of drug-metabolizing enzymes in relation to individual susceptibility to industrial chemicals. En: Industrial Health. Vol. 38 (2000). p. 143-152].
37. GASPAR, P. A. *et al.*, Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. En : American Journal of Physical Anthropology. Vol. 119. (2002). p. 249-256. Citado por: GATTÁS, G. J. *et al.*, Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. En : Brazilian journal of medical and biology Research. Vol. 37. (2004). p. 451-458.
38. HURST, R., *et al.*, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. En : Biochem Journal .Vol. 332 (Pt 1). (1998). p. 97-100.
39. NAKAJIMA, Taime. Cytochrome P450 isoforms and the metabolismo f volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. Department of

- hygiene, Shinshu University School of Medicine. En : Journal of Occupational Health Review. Vol. 39. (1997). p.83-91.
40. PEÑA, GE. *et al.*, Evaluación epidemiológica de la exposición a solventes orgánicos en fábricas de pinturas y pegantes en Bogotá. Instituto Nacional de Salud, Seguro Social; (1996).
41. HAYES, J., FLANAGAN, J., JOWSEY, I. Glutathione S-transferases. En : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicology. Vol. 45. (2005). p.51–88.
42. JACOBY. The Glutathione-S-Transferase, a group of multifunctional detoxification proteins. En : Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol, Vol. 46. (1978). p.383-414. Citado por: SRAM. Effect of Glutathione S-transferase M1 polymorphisms on Biomarkers of exposure and effects. En : Environmental Health Perspectives. Vol.106, Sup 1. (1998). p.231-239.
43. TANINGHER, M. *et al.*, Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. En : Mutation Research. Vol. 436. (1999). p. 227-261.
44. HATAGIMA, A. Cancer del ao del susceptibilidade del na de los endocrinos de los desreguladores de dos del metabolismo de los genéticos e de polimorfismos. En: Cad. Saude Publica. Vol. 18. No 2(2002)
45. REBBECK, TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. En : Cancer Epidemiology Biomarkers Prev. Vol. 6. (1997). p. 733-743.
46. BRUHN, C., *et al.*, Concordancen enzyme activity and genotype of glutathione S-trasnferase (GSTT1). En : Biochemical Pharmacology. Vol. 56. (1998). p. 733-743.
47. SRAM. Effect of Glutathione S-transferase M1 polymorphisms on Biomarkers of exposure and effects. En : Environmental Health Perspectives. Vol.106, Sup 1. (1998). p.231-239.
48. ZHONG S., *et al.*, Glutathione S-tranferase mu locus: use of genotyping and phenotyping asseys to assess association with lung cancer susceptibility. En : Carcinogenesis Vol.12.(1991). p. 1533-1537.
49. CHECA, M. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. En: Revista Del Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Vol. 20, No 3 (2007). p. 213-221

50. Lin, MT., et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. En: N Engl Journal Medical. Vol. 349 (2003). p.2201-2210. Citado por: Revista Del Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Vol. 20, No 3 (2007). p. 213-221
51. BOARD, P. *et al.*, Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. En: Pharmacy. Vol. 48. (1990). p. 357-369.
52. NORPPA H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. Environmental health perspectives. Vol.105, supplement 4. (1997). p.829-835.
53. HIRVONEN, A., Gene-environment interaction and biological monitoring of occupational exposures. En : Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 207. (2005). p. S329 – S335.
54. WIENCKE, J. K, *et al.*, Gene deletion of glutathione S-transferase θ : correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. En : Cancer Epidemiology. Biomarkers Prev. Vol.4. (1995) p.253-259.
55. HIRNOVEN, A. *et al.*, The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. En : Carcinogenesis. Vol. 14. (1993). p. 1479-1481.
56. STRANGE, RC, *et al.*, Glutathione-S-transferase family of enzymes. En : Mutation Research. Vol. 482. (2001). p. 21-6.
57. LANDI, *et al.*, Repeated analysis of sister chromatid Exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes: effect of glutathione S-transferase T1 and M1 genotype. En : Mutation Research. Vol. 351. (1996). p. 79-85.
58. SEIDEGARD, J. *et al.*, The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. En : Human. Genetic. Vol. 69. (1985). p.66-68.
59. LAN, Q. *et al.*, Glutathione S-transferase genotypes and stomach cancer in a population-based case-control study in Warsaw, Poland. En : Pharmacogenetics. Vol. 11. (2001). p.655-661.

60. KADLUBAR, F., Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. En : Mutation Research .Vol. 482. (2001). p. 111–113.
61. EISENBRAND, G. *et al.*, Methods of in vitro toxicology. En: Food and Chemical Toxicology. Vol. 40. (2002). p. 193–236.
62. ROJAS, *et al.*, Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. En: Anti-cancer Drugs. Vol. 4. (1993). p. 637-640.
63. BROADHEAD, CL., COMBES, R.D. The current status for food additives toxicity testing and the potential for application of the three. En : ATLA. Vol. 29. (2001); p.471-485
64. TALASKA, G. *et al.*, Carcinogen biomonitoring in human exposures and laboratory research: validation and application to human occupational exposures. En : Toxicology Letters. Vol. 134. (2002). p.39–49.
65. ROSSNER, *et al.*, Chromosomal Aberrations in Lymphocytes of Healthy Subjects and Risk of Cancer. En : Environmental Health Perspectives Vol. 113. No. 5. (2005). p. 515-520.
66. HAGMAR L. *et al.*, Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: result from Nordic and Italian Cohorts. En : Cancer Research. Vol. 64. (2004). p. 2258-2263.
67. LUCAS, J., *et al.*, Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization. En : Int Journal radiat Biol. Vol. 56. (1989). p.35-44.
68. CAJAS SALAZAR, Noelia y SIERRA TORRES, Carlos Hernan. Estudios de los efectos citotóxicos y genotóxicos del insecticida Miral 500CS, mediante pruebas mutagenicas in-vitro y citogenéticas in-vivo. En : Trabajo de grado (Lic. Biología) Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. (1996) Popayán. p. 52.
69. GUDRUN A. and SCHIMMER O. Induction of structural chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro by aristolochic acid. En : Human Genetics. Vol. 64. (1983). p. 131-133.

70. BONASSI, S. *et al.*, Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. En: Cancer research. Vol. 60. (2000). p. 1619-1625.
71. NORPPA H., Genetic polymorphisms and chromosome damage. En : International Journal of Higiene and Environmental Health. Vol. 204. (2001). p. 31 – 38.
72. HIDALGO, V., LONDOÑO, E. Daño genético y/o apoptótico inducido *in vitro* por el tiner (mezcla de solventes orgánicos) en linfocitos humanos de sangre periférica, evaluado a través del ensayo cometa alcalino. Popayán, (2007), 98 p. Tesis (biólogo): Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, exactas y de la educación.
73. ADDEL-RAHAMAN, S., *et al.* A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GsTT1 genes in population studies. En: Cancer Letters. Vol. 107. (1996). p. 229-233
74. HALIFEOGLU, I. *et al.*, Effect of thinner inhalation isolation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. En : Cell Biochemistry and Function. Vol. 18. (2000). p. 263–267.
75. TOKUNAGA, I. *et al.*, Toluene inhalation induced 8-hydroxy-20-deoxyguanosine formation as the peroxidative degeneration in rat organs. En : Legal Medicine (Tokyo) Vol. 5. No. 1 (2003). p. 34–41.
76. TORAASON, M. *et al.*, Effect of perchloroethylene, smoking, and race on oxidative DNA damage in female dry cleaners. En : Mutation Research. Vol. 539. (2003). p. 9–18.
77. VODICKA, P. *et al.*, Spectrum of styrene-induced DNA adducts: the relationship to other biomarkers and prospects in human biomonitoring. En : Mutation Research. Vol. 511. (2002). p. 239–254.
78. HOYOS, L.S. Susceptibilidad genética y efectos genotóxicos por exposición ocupacional a solventes orgánicos. Medellín, 2003. Trabajo de grado (Magíster en salud ocupacional). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Naturales y exactas. Área genética.
79. THIER, R., *et al.*, Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts. En: Toxicology letters. Vol. 127 (2002). p.321-327

80. CARRANO, A.V. Chromosomal alterations as a marker of exposure and effect. En : Journal Occupational Medical. Vol. 28. (1986). 1112–1116.
81. OSTROSKY-WEGMAN, P. *et al.*, Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. En : Mutation. Research. Vol. 250. (1991). p.477–482.
82. LERDA, D. Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. En : Mutation. Research. Vol. 312. (1994). p. 111–120.
83. LOFT, S. and POULSEN, H.E. Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage. En : Methods Enzymol. Vol. 300. (1999). p. 166–184. Citado por: BUTHBUMRUNGA, N. *et al.*, Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. En : Chemical-Biological Interactions. Vol. 172. (2008). p. 185–194.
84. VAINIO, H. *et al.*, Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. IARC scientific publication. Lyon. En : International Agency for Research on Cancer. Vol. 116. (1990). Citado por: ANTTILA, A. *et al.*, Cancer incidence among Finnish workers exposed to aromatic hydrocarbons. En : Int Arch Occupational Environmental Health. Vol. 71. (1998). p. 187-193.
85. HAYES, J.D., PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. En : Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 30. (1995). p. 445-600.
86. Anderson, D. *et al.*, Chromosome aberrations, mitogen- induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of U.K. population. En: Mutation. Research Vol. 204(1988). p 407–420. Citado por, Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. Toxicology in Vitro. Vol. 17 (2003). p. 35–40.
87. Montero, R. *et al.*, AS-101: a modulator of *in vitro* T-cell proliferation. En: Anti-Cancer Drugs. Vol. 4. (1993). p. 351–354. Citado por: LOPEZ NIGRO, *et al.*, Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. Toxicology *in vitro*. Vol. 17. (2003). p. 35–40.
88. VALENCIA, J., MOSQUERA, JV. Efecto apoptótico *in vitro* inducido por el tiner en linfocitos humanos aislados de sangre periférica, evaluado mediante citometría de flujo. Tesis (biólogo): Universidad del Cauca.

Facultad de Ciencias Naturales, exactas y de la educación. Popayán, (2008). p. 90.

89. HALL, A. G. Review The role of glutathione in the regulation of apoptosis. En : European Journal of Clinical Investigation. Vol. 29. (1999). p. 238-245.
90. AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. En : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90. (1993). p. 7915–7922. Citado por: SAGARA, Y. *et al.*, Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. En : Free Radical Biology & Medicine. Vol. 24. No. 9. (1998). p. 1375–1389.
91. COYLE, J. T. y PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. En : Science. Vol. 262. (1993). p. 689–695. Citado por: SAGARA, Y. *et al.*, Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. En : Free Radical Biology & Medicine. Vol. 24. No. 9. (1998). p. 1375–1389.
92. ADELMAN, R., SAUL, R. L. AMES, B. N. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. En : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85. (1988). p. 2706–2710. Citado por: SAGARA, Y. *et al.*, Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. En : Free Radical Biology & Medicine. Vol. 24. No. 9. (1998). p. 1375–1389.
93. CROUTE, F. *et al.*, Evaluation of the cytotoxic threshold of benzene and its chlorinated derivatives and related stress protein expression (Hsp72, Hsp90 and Grp78) in human cell in vitro. En: Fresenius Environmental. Bull. Vol. 9 (2000); p. 373–380.
94. McDERMOTT, C., *et al.* *In vitro* exposure of Jurkat T-cells to industrially important organic solvents in binary combination: Interaction analysis. En: Toxicological Sciences. Vol. 101. No. 2. (2008). p. 263-274.
95. HEUSER, *et al.*, Evaluation of genetic damage in Brazilia footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect and susceptibility. En : Toxicology. Vol. 232. (2007). p. 235-247.
96. SEIDEGÅRD, J. *et al.*, Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. En : Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 85. (1988). p. 7293-7297.
97. TUIMALA, J. *et al.*, Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and

- chromosomal aberrations. En : Mutation Research. Vol. 554. (2004). p. 319–333.
98. RINSKY, R. *et al.*, Benzene and leukemia. En : New England Journal of Medicine. Vol. 316. (1987). p. 1044-50.
99. HUKKANEN, J. Xenobiotic-metabolizing cytochrome p450 enzymes in human lung. En : Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu OULU. (2000). D 621.
100. LHAN ONARAN, *et al.*, The influence of *GSTM1* null genotype on susceptibility to in vitro oxidative stress. En: Toxicology. Vol. 157. (2001). 195–205.
101. DREIEM, A., MYHRE, O. y FONNUM, F. Relationship between lipophilicity of C6-10 hydrocarbon solvents and their ROS-inducing potency in rat cerebellar granule cells. En: Neurotoxicology, Vol. 23, No 6. (2002); p. 701-709.
102. MARTINEZ-VELAZQUEZ, M., *et al.*, Benzene metabolites induce apoptosis in lymphocytes. En: Exp Toxicology Pathol. Vol. 58. No.1. (2006). p. 65-70.
103. HIRAKU, Y. and KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. En: Cancer Res. Vol. 56. No.22 (1996). p. 5172-8.
104. BUTHBUMRUNGA, N. *et al.*, Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. En: Chemico-Biological Interactions. Vol. 172 (2008). p. 185–194.
105. KAM, P.C. and FERCH, N.I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. En: Anesthesia. Vol. 55. No. 11. (2000). p. 1081-93.
106. MATTIA, C.J., ADAMS, J.D., BONDY, S.C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 46. (1993). p. 103–110.
107. MATTIA, C.J., ALI, S.F., BONDY, S.C. Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. En: Mol. Chem. Neuropathol. Vol. 18. (1993). p. 313–328.

108. MATTIA, C.J., LEBEL, C.P., BONDY, S.C. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 42. (1991). p. 879–882.
109. CALDERÓN-GUZMÁN, D., *et al.* Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na⁺/K⁺-ATPase in adult rat brain. En: Neurochem. Res. Vol. 30. (2005). p. 619–624.
110. MYHRE, O., FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 62. (2001). p. 119–128.
111. 87. KURKNER, A. *et al.*, The effect of xylene inhalation on the rat liver. En: Acta Physiol. Hung. Vol. 85. (1997). p. 231–241.
112. ZHANG, L., EASTMOND, D.A. and SMITH, M.T. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. En : Crit. Rev. Toxicology. Vol. 32. No. 1. (2002). p. 1–42. Citado por: ROMATORRES, J. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. En: Mutation Research. Vol. 604. (2006). p. 19–27.
113. KIM, S.Y. *et al.*, Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. En : Pharmacogenetics Vol. 7. (2004). p. 453–463 Citado por: CHANVAIVIT, S. Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. En : Mutation Research. Vol. 626. (2007). p. 79–87.
114. ZHANG, H. *et al.*, Glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes in normal mucosa, transitional mucosa and colorectal adenocarcinoma. En : Int. Journal. Cancer. Vol. 84. (1999). p. 135–138. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–283.
115. BARTSCH, H. *et al.*, Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: studies in smokers, tobacco chewers, and coke oven workers. En : Cancer Detect Prev. Vol. 23. (1999). p. 445–453. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–283.

116. NISE G. *et al.*, Cytogenetic effects in rotogravure printers exposed to toluene and benzene. En : Mutation Research. Vol. 261. (1991). p. 217-223. Citado por: Study of the Genotoxicity of Toluene. En : Archives of Environmental Health. Vol. 55. No. 4. (2000). p. 268-273.
117. PELCLOVA, D., ROSSNER, P. and PICKOBA, J. Chromosome aberrations in rotogravure printing plant workers. . En: Mutation Research. Vol. 245. (1990). p. 581-585. Citado por: AKSOY, H. *et al.*, Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. En : Journal of applied toxicology. Vol. 26. (2006). p. 10–15.
118. RICHER, C. L. *et al.*, Cytogenetic effects of low level exposure to Toluene, xylene and their mixture on human blood lymphocytes. International Journal occupational Environmental Health. Vol. 64. (1993). p. 581-585.
119. HAMMER, K. D. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure printing plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. En : Mutation Research. Vol. 519. (2002). p. 171–177.
120. LYNGE, E., *et al.* "Organic solvents and cancer." Cancer Causes Control. Vol. 8. No. 3. (1997). p. 406-19.
121. LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247-283.
122. HEMMINKI, K. *et al.*, Exposure of bus and taxi drivers to urban air pollutants as measured by DNA and protein adducts. En : Toxicology. Letters. Vol. 72. (1994). p.171–174.
123. BOLOGNESI, C. *et al.*, Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. En : Environmental. Molecular. Mutagen. Vol. 30. (1997). p. 396–402.
124. MEDINSKY, M.A., Kenyon E.M., Schlosser P.M., Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. En : Toxicology. Vol. 105. No. 2–3. (1995). p. 225–233.
125. NILSSON, R.I. *et al.*, Genotoxic effects in workers exposed to low levels of benzene from gasoline. En : American Journal Ind. Medical. Vol. 30. (1996). p.317–332. Citado por: CHANVAIVIT, S. *et al.*, Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. En : Mutation Research. Vol. 626. (2007). p. 79–87.

126. DREIEM, A., MYHRE, O., FONNUM, F. Relationship between lipophilicity of C6–10 hydrocarbon solvents and their ROS-Inducing otency in rat cerebellar granule cells. En: NeuroToxicology. Vol. 23. (2002). p. 701–709
127. SETIAWAN, V. *et al.*, GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer. Acase control study in a Chinese population. En : Cancer Epidemiology. Biomarkers Prev. Vol. 9. (2000). p. 73-80.
128. LOSI-GUEMBAROVSKI, R. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): ethnic distribution and relation with cancer. En : Semina Ci. Biol. Saúde, Londrina. Vol. 22. (jan./dez. 2001). p.3-9.
129. IARC (International Agency for Research on Cancer). Some industrial chemicals. Lyon. En : IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 60. (1994). p. 233-320. Citado por: Cancer incidence among Finnish workers exposed to aromatic hydrocarbons. En : International Archives Occupational Environmental Health. Vol. 71. (1998). p. 187-193.
130. D'ERRICO, A. *et al.*, Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer. In: Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Lyon. En : International Agency for Research on Cancer Press. (1999). p. 323-394.
131. WANG, X. *et al.*, Genetic Susceptibility to Benzene and Shortened Gestation: Evidence of Gene-Environment Interaction. En : American Journal of epidemiology. Vol. 152. No. 8. (October 15). (2000).
132. WAN, J. *et al.*, Association of Genetic Polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 Genes with Benzene Poisoning. En : Environmental Health Perspectives. Vol. 110. No. 12. (December 2002). p. 1213-1218.
133. VINEIS, *et al.*, Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Publications, Lyon, France (1999).
134. WÜNSCH, FILHO V. y GATTÁS, G.J.F. Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. En : Cadernos de Saúde Pública, Vol. 17. (2001). p. 467-480.
135. PÉREZ, M. Rebeca. *et al.*, Frecuencia de los polimorfismos nullos de los biomarcadores gstm1 y gstt1 en población mexicana. En : Edición Especial. No. 5 (2006).

136. FALCK, G. *et al.*, Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed green house workers. En : Mutation Research. Vol. 441. (1999). p. 225-237.
137. BERNARDINI *et al.*, Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on sister chromatid exchange induction by styrene in culture human lymphocytes. En : Carcinogenesis. Vol. 23. (2002). p. 893-897.
138. HIRVONEN, A. *et al.*, Glutathione S-transferase M1 genotype influences sister chromatid exchange induction but not adaptive response in human lymphocytes treated with 1,2-epoxy-3-butene . En : Mutation Research. Vol. 439. (1999). p. 207–212.
139. SILVA, *et al.*, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Genotypes and the genotoxicity of Hydroquinone in human lymphocytes. En : Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 43. (2004). p. 258-264.
140. The Nordic study group on the health risk of chromosomal damage. An Inter.-Nordic prospective study on cytogenetics endpoints and cancer risk. En : Cancer Genet. Cytogenetic. Vol. 45. (1990). p. 85-92.
141. UUSKULA, M., *et al.*, Influence of GSTM1 genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide and 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes. En : Carcinogenesis. Vol. 16 (1995); p. 947-950. Citado por: THIERA, R. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the roles of selected CYP, NAT and GST genes. En : Int. Journal. Hyg. Environmental. Health. Vol. 206. (2003). p.149- 171
142. THIERA, R. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology : the roles of selected CYP , NAT and GST genes. En : Int. J. Hyg. Environ. Health. Vol. 206. (2003). p.149- 171
143. TASA, G. *et al.*, Distribution of glutathione S-transferase T1 phenotypes in the Estonian population. En : Gene Geogr. Vol. 10. (1996). p. 181–189. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
144. SCHRÖDER, KR. *et al.*, Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes. En : Biochem Pharmacol. Vol. 43. (1992). p. 1671-74.

145. JOURENKOVA-MIRONOVA, N. *et al.*, Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. En : Int. J. Cancer. Vol. 31. (1999). p. 44–48. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
146. NELSON, H. *et al.*, Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. En : Carcinogenesis. Vol. 16. (1995). p. 1243–1245. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
147. SHEN, J. *et al.*, Glutathione transferase T1 and M1 genotype polymorphism in the normal population of Shanghai. En : Arch. Toxicology. Vol. 72. (1998). p. 456–458. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
148. CHEN, C.L., LIU, Q., RELLING, M. V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. En : Pharmacogenetics. Vol. 6. (1996). p. 187–191. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
149. OKE, B. *et al.*, GSTT1 null genotype frequency in a Turkish population. En : Archives Toxicology. Vol. 72. (1998). p. 454–455. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
150. LEE, E. J. *et al.*, Glutathione S-transferase-theta (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. Pharmacogenetics. (1995). p. 332–334. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
151. SAARIKOSKI, S. T. *et al.*, Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. En : Int. J. Cancer. Vol. 77. (1998). p. 516–521. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.

152. ARRUDA, V. R. *et al.*, Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis?. En : Clin. Genetic. Vol. 54. (1998). p. 210–214. Citado por: LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. En : Mutation Research. Vol. 463. (2000). p. 247–28.
153. Xu, X. *et al.*, Benzene exposure, glutathione S-transferase theta homozygous deletion, and sister chromatid exchanges. En : Am Journal Ind Med. Vol. 33. (1998). p. 157-163.
154. JOURENKOVA-MIRANOVA, N. *et al.*, Role of glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes in modulating susceptibility to smoking- related lung cancer. En : Pharmacogenetics. Vol. 8. (1998). p. 495- 502.
155. INTERNATIONAL LABOR OFFICE. Industrial Solvents. In Parmeggiani L. (ed). Encyclopedia of Occupational Health and Safety. INTERNATIONAL LABOR OFFICE, Geneva, Switzerland, (1994). p. 2085-2088. Citado por: SCHENKER, M., JACOBS, J.A. Review article. Respiratory effects of organic solvent exposure. En : Tubercle and Lung Disease. Vol. 77. (1996). p. 4-18.
156. ANTTILA, S. *et al.*, Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: Association with GSTM1 polymorphism, smoking and asbestos exposure. En : Cancer Research. Vol. 55. (1995). p. 3305-3309.
157. LONDON, S.J. *et al.*, Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians in Los Angeles county, California. En . Journal Natl Cancer Inst. Vol. 87. (1995). p. 1246-1253.
158. MCWILLIAMS, *et al.*, Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. En : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Vol. 4. (1995). p. 589-594. Citado por: SRAM, Effect of Glutathione S-transferase M1 polymorphisms on Biomarkers of exposure and effects. En : Environmental Health Perspectives. Vol. 106. Sup. 1. (1998). p. 231-239.
159. COTTON, S.C. *et al.*, Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. En : American Journal of Epidemiology. Vol. 151. (2000). p. 7-32. Citado por: GATTÁS, G. J. *et al.*, Ethnicity and

- glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. En : Brazilian journal of medical and biology. Research. Vol. 37. (2004). p. 451-458.
160. PARL, F. Mini review. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. En : Cancer Letters. Vol. 221. (2005). p. 123–129.
161. BINKOVÁ, *et al.*, Biomarkers in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (Abstract) Vol. 29. S. 5. (1997). Citado por: SRAM. Effect of Glutathione S-transferase M1 polymorphisms on Biomarkers of exposure and effects. En : Environmental Health Perspectives. Vol.106. Sup. 1. (1998). p. 231-239.
162. BROCKMÖLLER, J. *et al.*, Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. En : Cancer Research. Vol. 54. (1994). p. 4103-4111.
163. ENGEL, L. S. *et al.*, Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. En : American Journal Epidemiology. Vol. 156. No. 2. (2002). p. 95-109.
164. ROODI, N. *et al.*, Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. En : Cancer Res. Vol. 64. (2004). p. 1233–36.
165. NAKATA, C. *et al.*, Biomarcadores de Susceptibilidade à Endometriose. En : Trabalhos Originais. Vol. 26. No. 4. (2004). p. 299-304.
166. RYBERG, D. *et al.*, Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung adduct levels and cancer risk. En : Carcinogenesis. Vol. 18. (1997). p.1285–1289. Citado por: STRANGE, R. C., JONES, P.W. and FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. En : Toxicology Letters. Vol. 112–113. (2000). p. 357–363.
167. LEE, S. J. *et al.*, Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk. En : Cancer Letters. Vol. 177. No. 2. (Mar, 28). (2002). p. 173-9.
168. MATTHIAS, C. *et al.*, Polymorphism in cytochrome P450 CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. En : Pharmacogenetics. Vol. 8. (1998). p. 91–100. Citado por: STRANGE, R. C.,

- JONES, P.W. and FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. En : Toxicology Letters. Vol. 112–113. (2000). p. 357–363.
169. MOISIO, A. L. Genetic polymorphisms in carcinogen metabolism and their association to hereditary non polyposis colon cancer. En : Gastroenterology. Vol. 115. (1998). p. 1387–1394. Citado por: STRANGE, R. C., JONES, P.W. and FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. En : Toxicology Letters. Vol. 112–113. (2000). p. 357–363.
170. HOWELLS, R.E.J. *et al.*, Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes with clinical outcome in epithelial ovarian cancer. En : Clin. Cancer Research. Vol. 10. (1998). p. 2439–2445. Citado por: STRANGE, R. C., JONES, P.W. and FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. En : Toxicology Letters. Vol. 112–113. (2000). p.357–363.
171. LEE, Kuen. Cytochrome P4501A1 (CYP1A1), glutathione S transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and their association with smoking and alcohol consumption as gastric cancer susceptibility biomarkers. En : Rev, méd. Chile. Vol. 134. No. 9. (sep.2006). p.1107-1115.
172. CAI, L.; Yu, S. and ZHANG, Z. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk of gastric cancer: A case-control study. En : World J. Gastroenterol. Vol. 7. (2001). p. 506-509.
173. TORRES, M., SICARD, D., GROOT, H. Susceptibilidad genética y riesgo de cáncer gástrico en una población del Cauca. En : Biomedica. Vol. 24. No. 2. (2004).
174. RIOJA, Z. *et al.*, Expresión del receptor de esteroides y xenobióticos (SXR) y del gen de multiresistencia drogas (MDR1) y de los polimorfismos de las enzimas GSTs, SULTs y CYP en tumores vesicales profundos, análisis de su expresión y correlación con otros factores pronósticos. En : Actas Urol Esp. Vol. 31. No. 10. (2007). p. 1107-1116.
175. PARK, S.K. *et al.*, Combined effect of GSTM1, GSTT1, and COMT genotypes in individual breast cancer risk. Breast. En : Cancer Research Treat. Vol. 88. No. 1. (Nov. 2004). p. 55-62.

176. DUŠINSKÁ, M. *et al.*, Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. En: Mutation Research. Vol. 482. (2001). p. 47–55.
177. DREIEM, A., MYHRE, O., FONNUM, F. Relationship between lipophilicity of C6–10 hydrocarbon solvents and their ROS-Inducing otency in rat cerebellar granule cells. En: Neuro Toxicology. Vol. 23. (2002). p. 701–709.
178. PEÑA, G.E., *et al.* Evaluación epidemiológica de la exposición a solventes orgánicos en fábricas de pinturas y pegantes en Bogotá. Instituto Nacional de Salud, Seguro Social. (1996); p. 1-28.
179. MAYOR, J., *et al.* Estudio de los efectos sobre el sistema nervioso de la exposición potencial a solventes orgánicos. Bogotá. Instituto de Seguros Sociales. (1998).
180. PINTO, D., CEBALLOS, J., GARCIA, G. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. En: J. Urol. Vol. 467 (2000); p. 105-111.
- 181.17. PITARQUE, M., *et al.* Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. En: Mutation research. Vol. 441 (1999); p. 115-127.
- 182.18. ZHU, C., LAM, T., JIANG, C. Lymphocyte dna damage in bus manufacturing workers. En: J. Urol. Vol. 491 (2001); p. 173-181.
- 183.19. CROUTE, F. Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP90 and GRP78 STRESS PROTEINS in cultured human cells. En : Biochimica et biophysica Acta. Vol. 159. No. 1-3. (aug 19- 2002). p. 147-155.
- 184.20. PISCOYA, J. Toxicidad de los solventes como riesgo ocupacional. En: Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna. Vol. 13, No. 1 (2000).
- 185.21. ALGUACIL, J., *et al.* Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. En: Carcinogenesis. Vol. 23 (2002); p. 101-106.
- 186.22. BLAIR, A., *et al.* Mortality and cancer incidence of aircraft maintenance workers exposed to trichloroethylene and other organic solvents and chemicals: extended follow up. En: Occup. Environ. Med. Vol. 55 (1998); p. 161-171.

- 187.23. BRAUTBAR, N., WILLIAMS, J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. En: Int. J. Hyg. Environ. Health. Vol. 205 (2002); p. 479-491.
- 188.24. REGO, M., *et al.* Non-Hodgkin's lymphomas and organic solvents. En: J. Occup. Environ. Med. Vol. 44 (2002); p. 874-881.
- 189.33. RICHER, C., *et al.* Cytogenetic effects of low-level exposure to toluene, xylene, and their mixture on human blood lymphocytes. En: Int Arch Occup Environ Health. Vol. 64 (1993); p. 581-585, citado por U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY IRIS. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Op. cit. (2005); p. 55.
190. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Methylene Chloride. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR (1991a). Draft for public comment.
191. ROOS, W.P., KAINA, B. Dna damage-induced cell death by apoptosis. En: Trends in Molecular medicine. Vol. 12, No. 9 (2006); p. 440-448.
192. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Styrene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR (1992e). TP-91/25.
193. BEVING, H., TORNLING, G., OLSSON, P. Increased erythrocyte volume in car repair painters and car mechanics. En: Br. J. Ind. Med. Vol. 48 (1991); p. 499-501.
194. MOLVEN, A., GOKSØYR, A. Biological effects and biomonitoring of organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. En: Ecotoxicology Monitoring, M. Richardson, ed. (New York: VCH Publishers), (1993). p. 137-162.
195. MORAN, J.L., *et al.* Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. En: molecular pharmacology. Vol. 50, No. 3 (1996); p. 610-615.
196. CÁRDENAS-BUSTAMANTE, O., *et al.* Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá. En: Rev. Salud pública. Vol. 9, No. 2 (2007); p. 275-288.
197. NATL. RES. COUNC. Biological Markers in Immunotoxicology. Washington, DC: Natl. Acad. Press. (1989); 206 p.

198.NATL. RES. COUNC. COMM. BIOL. MARKERS. Biological markers in environmental health research. En: Environ. Health Perspect. Vol. 74 (1987); p.3-9

ANEXO 1

Efecto modulador del polimorfismo de los genes del metabolismo (GSTT1 y GSTM1) en la inducción de alteraciones cromosómicas (*in vitro*) por el tiner en linfocitos humanos Protocolo de la prueba de alteraciones cromosómicas

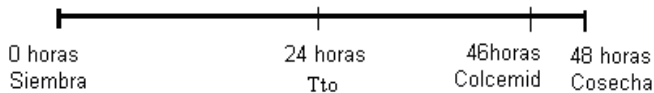
Fecha del experimento _____ Hora de establecimiento del cultivo Día _____ Hora _____
 Tratamiento Día _____ Hora _____
 Cosecha Día _____ Hora _____

Siembra No _____

Responsables: _____

No	Código Paciente	Sangre (Gotas)	Tratamiento químico	Concentración	Observaciones
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Protocolo de la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs).



Mitomicina C _____ ml

Hipotónica _____ ml

Preparación medio de cultivo

Tener presente el numero de cultivos de 5ml que van a establecer para calcular la cantidad de medio a preparar.

No pacientes _____ x 5ml = _____ ml medio

10% Suero bovino fetal _____ ml

1% L-glutamina _____ ml

1% Antibiotico _____ ml

RPMI _____ ml

TOTAL _____ ml

Fitohemaglutinina x cultivo _____ ml

Total de fitohemaglutinina _____

ANEXO 2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____, mayor de edad, identificado con cedula de ciudadanía No _____ de _____, he sido informado que las estudiantes **YOLY DAYANA MORENO** y **CATHERIN YURANY GONZÁLEZ** de décimo semestre de la Universidad del Cauca realizarán el estudio sobre el **“EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO (GSTT1 Y GSTM1) EN LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (IN VITRO) POR EL TÍNER EN LINFOCITOS HUMANOS”** en personas no expuestas a solventes orgánicos en la ciudad de Popayán. Se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPOSITO DEL ESTUDIO. Evaluar el efecto genotóxico del tiner en linfocitos humanos (*in vitro*) y la modulación por el polimorfismo de los genes del metabolismo GSTM1 y GSTT1, mediante la determinación de la frecuencia de alteraciones cromosómicas.

Los resultados de este estudio son de gran utilidad para motivar al diseño y ejecución de estrategias de prevención de problemas de salud por exposición a los solventes orgánicos como implementación de medida de higiene, de protección y educación.

YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPOSITOS, JUSTIFICACION, METODOLOGIA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO. En este estudio serán seleccionados 20 individuos saludables de genero masculino no expuestos a agentes químicos (solventes orgánicos), con los que se conformaran 4 grupos con diferentes juegos de genotipos, con relación a los genes GSTT1 y GSTM1, con 5 personas cada uno. También se obtuvo información sobre la edad y la presencia de hábitos tóxicos (alcohol y tabaquismo). El propósito de la investigación tiene relevancia social y científica y obedece a una problemática de salud ocupacional. Participar en este estudio supone un mínimo riesgo espacial contra mi salud, por la competencia, formación integral y calidad de los investigadores responsables de la Universidad del Cauca.

Los resultados son confidenciales y serán informados y explicados en forma general al grupo objeto de estudio por parte de la directamente responsables del estudio.

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 mí, lo siguiente: contestar un cuestionario en aproximadamente 20 minutos, para suministrar la información personal referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar. Si soy seleccionado para el estudio debo donar 30ml de sangre tomada de la vena del brazo para ser procesada en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, mediante la prueba de alteraciones cromosómicas para detectar cambios irreversibles usados como biomarcadores e indicadores de exposición de una población expuesta a solventes orgánicos.

RIESGOS DE PARTICIPACION. Los riesgos potenciales de participación en el estudio son el sangrado e infección en el sitio de la toma de la muestra de sangre, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de muestras de sangre del brazo, y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y jeringas estériles nuevas.

Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada y la confiabilidad de los resultados, las muestras de sangre serán codificadas y los resultados se darán de forma grupal,

Tengo claro que no se me proveerá con ninguna compensación económica.

BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE. Atender a un seminario de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud, por la exposición a solventes orgánicos. Motivación hacia el cambio de actitud para la prevención riesgos a la salud por exposición a solventes orgánicos.

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

La información recolectada será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de otros participantes para obtener resultados grupales. Con base en lo anterior autorizo la divulgación oral y publicación de los resultados del estudio en revistas científicas, de manera global, sin mencionar mi nombre.

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 las estudiantes Yoly Dayana Moreno y Catherin Yurany González, responsables del estudio por parte de la Universidad del Cauca en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética.

La firma del documento del consentimiento informado es requisito esencial por parte de todas las personas en un estudio como este.

Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje claro que yo he podido entender. Los riesgos y molestias que puedan presentarse me han sido explicados claramente.

Entiendo que las células sanguíneas y material genético sobrantes, que no sean usadas en este estudio, permanecerán en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, y podrán ser empleadas en futuras investigaciones para identificar individuos que estén en mayor riesgo de desarrollar problemas de salud debido a ciertas características de su ADN y exposición. Mi nombre y otra información que me pudiese identificar, no estará disponible y no será posible su vinculación con estos especímenes. También entiendo que como mi nombre no será vinculado con los resultados del estudio, los responsables no estarán en la posibilidad de informar a ninguna otra persona sobre los resultados míos en las pruebas.

He leído este consentimiento informado, he entendido en que consiste este estudio y me fueron aclaradas las dudas al respecto; en consecuencia, voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el **“EFECTO MODULADOR DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL METABOLISMO (GSTT1 Y GSTM1) EN LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (IN VITRO) POR EL TINER EN LINFOCITOS HUMANOS”**.

Nombre del participante

Firma del participante

Nombre del testigo

Firma del testigo

Firmado en la ciudad de Popayán a los _____ días del mes de _____ de 2007.

ANEXO 5

Efecto modulador del polimorfismo de los genes del metabolismo (GSTT1 y GSTM1) en la inducción de alteraciones cromosómicas (*in vitro*) por el tiner en linfocitos humanos

REGISTRO DE PRUEBA CITOTÓXICA (Índice mitótico)

Registrado por: _____

Fecha de registro: _____

Cod	Tratamiento	Conc. µl/ml	Nº células	Nº metafases
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				
TOTAL				

