

**DAÑO EN EL DNA DE LINFOCITOS, POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A PINTURAS Y
SOLVENTES ORGÁNICOS, IDENTIFICADO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA ALCALINO
EN PINTORES DE CARROS DE POPAYÁN**

NATALIA MENDOZA FERREIRA

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

**Mg. LUZ STELLA HOYOS
Directora**

**Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL
Asesor**

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

POPAYÁN

2007

INTRODUCCIÓN

El manejo de sustancias químicas en los lugares de trabajo es un problema de gran importancia en la actualidad; pues estudios epidemiológicos han aportado evidencia que permiten asegurar que enfermedades como el cáncer tienen origen (80%-90%) en la exposición ocupacional/ambiental (Weinstein *et al*, 1993). Luego, debe ser pertinente y prioritario la identificación de los efectos genotóxicos tempranos producto de tal exposición para intervenir oportunamente en la identificación, reducción o eliminación de los factores de riesgo en pro de un mejoramiento de la calidad de vida de las personas comprometidas en esta problemática.

Según la IARC (IARC, 1989) “existe evidencia suficiente en humanos y en animales de carcinogenicidad por la exposición ocupacional a solventes en pintores, sin embargo es reportada evidencia inadecuada de carcinogenicidad por la exposición ocupacional en la fabricación de pinturas”. En Popayán, los pintores de carros se consideran como un grupo en riesgo, pues se exponen diariamente a sustancias químicas tóxicas, como solventes orgánicos, mezclas complejas de solventes, como el *thinner*, pinturas que contienen pigmentos a base de plomo y monómeros plásticos residuales. Actualmente la exposición a solventes orgánicos en los lugares de trabajo se considera un problema de salud pública (Lynge *et al*, 1997).

Los solventes orgánicos son sustancias volátiles y lipofílicas, por lo que pueden ingresar al cuerpo a través de las vías respiratoria y dérmica; tienen efectos muy bien documentados sobre los sistemas nervioso y respiratorio, algunos son hepatotóxicos (Spandorfer *et al*, 2001) y pueden causar disfunciones reproductivas tanto en hombres como en mujeres (Kumar, 2004). Solventes orgánicos como el Benceno, Xileno, Tolueno, Metanol, Hexano, entre otros, pueden encontrarse en las sustancias de trabajo empleadas por la población objeto de estudio (Thiner y Pinturas) y han sido asociados con efectos mutagénicos carcinogénicos y clastogénicos (IARC, 1987; Pitarque *et al*, 1999a; Swanepoel *et al*, 2005). Existen mayores riesgos de padecer cáncer de pulmón, hígado, vejiga, colon, páncreas, boca, faringe, próstata, testículo, linfomas, mielomas, leucemias y tumores cerebrales como resultado de la exposición a solventes o mezclas de solventes orgánicos en el oficio de pintor (Lynge *et al*, 1996). La problemática de exposición ocupacional a solventes en la ciudad de Popayán involucra mayores riesgos de salud, ya que está influenciada por los largos turnos de trabajo, la deficiente ventilación de los talleres de lámina y pintura, el manejo irresponsable de sustancias químicas y la ausencia de medidas de protección que eviten el contacto directo con los solventes (uniformes de manga larga, guantes) o su inhalación (máscaras). La necesidad de dirigir estudios a esta población es evidente, a fin de corroborar la existencia de una exposición genotóxica en el lugar de

trabajo que permitirá formular acciones educativas y correctivas enfocadas en la prevención de riesgos y la promoción de la salud.

En las últimas décadas, el ensayo de cometa (electroforesis en gel de células individuales) ha cobrado fuerza e importancia como biomarcador de exposición en estudios *ex vivo* y actualmente se le considera como una herramienta valiosa para el monitoreo de poblaciones expuestas (Faust *et al*, 2004b). En general, esta técnica consiste en suspender una solución celular de linfocitos en agarosa sobre una placa portaobjetos que al ser sometidos a una solución de lisis liberan su DNA en forma de nucleóide. Un posterior tratamiento alcalino desenrolla y rompe el DNA en los sitios de lesión inducidos por agentes genotóxicos originando hebras ligeras de material genético que migrarán hacia el ánodo durante la electroforesis originando los cometas. La tinción final de las células con Bromuro de Etidio permite el registro de los parámetros de cometa (momento de cola y longitud de la cola) que son indicativo de daño genético. Debe resaltarse que la electroforesis de células individuales es aplicable a cualquier tipo de célula nucleada y en su versión alcalina permite detectar rupturas de cadena sencilla y doble del DNA, sitios lábiles al álcali, ligamientos cruzados del DNA y sitios intermedios de reparación por escisión de bases o nucleótidos (Rundell *et al*, 2003)

El principio biológico de esta prueba radica en que los daños en el DNA causados por un agente genotóxico se revelarán como hebras ligeras de material genético durante las fases de lisis y desenrollamiento alcalino y migrarán durante la electroforesis para formar la cola de los cometas, mientras que el DNA intacto permanecerá inmóvil y formará la cabeza. Cuanto mayor sea el daño genético, más grande será la cola del cometa y más elevados los valores de cuantificación de daño (Choucroun *et al*, 2001). Dado que las lesiones detectadas por el ensayo de cometa pueden ser reparables, los resultados obtenidos en este estudio deben considerarse como biomarcadores de exposición (Heuser, *et al*, 2007).

Para la realización de este estudio se seleccionaron 30 pintores de carros, expuestos por más de 5 años a solventes orgánicos y pinturas, que se aparearon por sexo y edad con un grupo referente; todos los participantes fueron hombres, saludables y no fumadores. El objetivo de este proyecto de investigación es cuantificar el daño en el DNA causado por la exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas, considerando la influencia del tiempo de exposición y la edad de los individuos de estudio en los parámetros de cuantificación de daño genético de cometa, longitud y momento de cola.

1. PROBLEMÁTICA

La exposición ocupacional de poblaciones humanas a solventes orgánicos puede considerarse como una realidad mundial, nacional y regional en razón de que una gran cantidad de oficios y procesos industriales dependen exclusivamente del empleo de este tipo de sustancias; tanto en la creación de nuevos materiales como para la transformación de materias primas (manufactura del cuero, producción de pinturas, barnices, lacas, elaboración de drogas y pesticidas, entre otros procesos). Aun cuando el empleo masivo de solventes está limitado a los ya mencionados procesos, debe reconocerse que existe una exposición considerable en otros sectores del trabajo (mantenimiento y pintura de automóviles, acabado de superficies), y a menor escala en el ámbito doméstico; pues actualmente son numerosos los productos de uso diario que contienen solventes orgánicos en su composición y cada vez mayores sus aplicaciones. Específicamente, el oficio en talleres de lámina y pintura de automóviles hace parte de la problemática de exposición ocupacional a solventes orgánicos, pues implica la manipulación diaria de disolventes complejos como el *thinner*, gasolina y pinturas, que si bien contienen solventes orgánicos, representan mayores peligros de exposición al contener material sólido, plomo, resinas, entre otros.

Existe “evidencia suficiente” en humanos y en animales de carcinogenicidad por la exposición ocupacional en pintores a solventes orgánicos, sin embargo es reportada “evidencia inadecuada” de carcinogenicidad por la exposición ocupacional en la fabricación de pinturas (IARC, 1989). Otras estadísticas publicadas por la IARC son aún más interesantes. En Italia, entre el 10 y el 16% de los trabajadores se encuentran expuestos a solventes orgánicos, y en Estados Unidos por lo menos 100.000 trabajadores se encuentran expuestos al Tolueno y 140.000 al Xileno. Puede afirmarse, con certeza, que la exposición a solventes orgánicos es una problemática de interés mundial con profundas implicaciones en la salud pública (Lynge *et al*, 1997). En Colombia no existe información acerca de grupos de trabajadores o número de personas expuestas a solventes orgánicos en los lugares de trabajo; sin embargo se conoce que Colombia produce y exporta grandes cantidades de solventes hacia otros países aportando a la economía local con varios miles de pesos al año (DANE, 1993)

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2001) considera el *thinner* y las pinturas de automóvil como mezclas complejas de solventes orgánicos, en las que pueden encontrarse: Xileno, Metanol, Tolueno, Benceno, Cloruro de metileno, Acetona, Metil isobutil acetona, 1,1,1-Tricloro-etano. Dada su gran volatilidad y carácter lipofílico, estos solventes orgánicos pueden ingresar al organismo por diferentes rutas de exposición (respiratoria, dérmica, oral) y causar efectos tóxicos (Löf and Johanson, 1998). Actualmente están muy

bien documentados, pues se sabe que estas sustancias causan alteraciones en los sistemas nervioso central y respiratorio (Spandorfer *et al*, 2001) y son responsables de daño hepático (Brautbar and Williams, 2002) y alteraciones de la piel, conducentes a dermatitis (Iavicoli, 2005). Sin embargo, estudios como este que propendan por la evaluación de genotoxicidad como resultado de las interacciones entre los solventes orgánicos o sus metabolitos con macromoléculas como el DNA son muy pocos, aunque se sabe, están asociados con alteraciones reproductivas de hombres y mujeres (Kumar, 2004) y algunos son considerados carcinogénicos, tanto en animales como en humanos (Swanepoel *et al*, 2005). Si se tiene en cuenta que en la exposición a solventes orgánicos en el oficio de pintor no se presenta un único compuesto químico sino mezclas de los mismos, podría pensarse que estas personas pueden tener implicaciones de salud más peligrosas (Hoyos, 2006) y por ende, estar en mayor riesgo de enfermedad, ya que entre los componentes de las sustancias de trabajo pueden ocurrir interacciones de adición, subadición, sinergia y potenciación, que pueden incrementar el nivel de daño genético (Dennison *et al*, 2004) asociado a los solventes orgánicos.

A nivel nacional y regional, la problemática de exposición está influenciada por otros aspectos. En esta investigación se considera como el más importante aspecto, el hecho de que los talleres de lámina y pintura de automóviles hacen parte de la industria informal de nuestro país, por lo que los trabajadores no poseen un servicio médico adecuado con un enfoque a la prevención de riesgos de salud. En segunda instancia, el bajo nivel de escolaridad (primaria) de los trabajadores parece ser generalizado, lo cual se sustenta en el desconocimiento acerca de las medidas de protección y de las consecuencias en la salud que puede traer la exposición a los solventes orgánicos. En estos talleres de pintura se accede a las sustancias más económicas del mercado, que desde luego son las más dañinas para los trabajadores, puesto que no están regidas por estándares nacionales o internacionales de calidad. Aún más alarmante resulta el hecho de que algunos trabajadores elaboran sus “propios” materiales de trabajo, mezclando por ejemplo varias clases de *thinner* o de pinturas, con el fin de conseguir mejores resultados, o que los turnos de trabajo pueden ser extremadamente largos, incluso superando las 8 horas diarias. Todas estas condiciones particulares también incrementan los riesgos de exposición genotóxica, por lo que la determinación de daños genéticos (prueba de cometa) alertan sobre la magnitud de daños precoces y motivan a una reflexión sobre el autocuidado, enfocado en la prevención de riesgos de salud.

Este estudio responde a las preguntas: ¿La exposición ocupacional a pinturas y solventes orgánicos induce daños en el DNA de linfocitos de sangre periférica, reflejados en un incremento de los parámetros de cuantificación de daño genético de cometa (longitud de cola y momento de cola)?, ¿Existe alguna relación entre los parámetros de cuantificación de daño genético de cometa y el tiempo de exposición a solventes orgánicos? y, ¿Existe alguna relación entre los parámetros de cuantificación de daño genético de cometa y la edad de los individuos objeto de estudio?

2. HIPÓTESIS

2.1. HIPÓTESIS ALTERNA

Si la exposición ocupacional a pinturas y solventes orgánicos induce daños en el DNA de los linfocitos de sangre periférica, se espera que los parámetros de cuantificación de daño genético de cometa (longitud de la cola y momento de cola) se incrementen significativamente en el grupo de trabajadores expuestos en relación con el grupo referente.

2.2. HIPÓTESIS NULA

Si la exposición ocupacional a pinturas y solventes orgánicos no induce daños en el DNA de los linfocitos de sangre periférica, se espera que los parámetros de cuantificación de daño de cometa (longitud de la cola y momento de cola) sean iguales tanto en el grupo de trabajadores expuestos como en el grupo control, o incluso menores.

3. JUSTIFICACIÓN

Entender la secuencia de eventos que empieza desde la exposición a una sustancia peligrosa, por ejemplo, en el lugar de trabajo, y que puede terminar en el desarrollo de enfermedad o muerte, es uno de los grandes retos de la epidemiología moderna (Bonassi *et al*, 2001a). Entender esa secuencia, nos permitirá interrumpir el curso natural de la historia de la enfermedad, ya sea alterando su progresión, o bien sea detectando fuentes de exposición peligrosa para removerlas como agentes causales. La herramienta epidemiológica que permite tales aproximaciones es el biomonitorio genético de poblaciones, que además de ser una alerta temprana permite identificar los factores de riesgo, bajo la influencia de factores de confusión, al mismo tiempo que se implementan medidas de control (Kassie *et al*, 2000).

La problemática de exposición a sustancias químicas tóxicas en los lugares de trabajo es una realidad mundial, que tiende a acentuarse más en países en vía de desarrollo como el nuestro, en razón de que las condiciones socioeconómicas de la población motivan a adoptar tecnologías y procesos riesgosos (por el inadecuado manejo de sustancias tóxicas) que al ser implementados extensivamente se convierten en oficios no formales de la industria. Oficios que no son reconocidos en programas de salud por autoridades gubernamentales, y son pobremente vigilados por entidades responsables de ofrecer programas preventivos de salud y vigilancia ocupacional. No debe omitirse el hecho de que factores como la falta de escolaridad en nuestro país conlleva un desconocimiento de las medidas mínimas de protección para tomarse en cuenta en los lugares de trabajo y de los estándares de calidad que rigen los productos implementados en el mismo. La exposición a solventes orgánicos y pinturas de la población objeto de este estudio no se aleja de la realidad ilustrada anteriormente y puede asegurarse que están en mayor riesgo de desarrollar enfermedades producto de la exposición. Aunque los resultados de los estudios de biomonitorio permiten extrapolar del riesgo a otras poblaciones expuestas de forma similar (Au, 1991), la realidad de nuestro país es diferente y como tal debe ser enfrentada de forma específica para obtener resultados enfocados a las características ambientales, étnicas, socioeconómicas culturales y genéticas de nuestra población.

La actividad de pintura de automóviles en la ciudad de Popayán se caracteriza por la exposición a varios tipos de solventes orgánicos contenidos en pinturas y en mezclas complejas, como el *thinner*. Debe resaltarse que en estas sustancias de trabajo se encuentran hidrocarburos aromáticos tales como Tolueno, Benceno y Xileno (Niño y Camargo, 1999) de cuya toxicidad se conoce bastante, puesto que son objeto de estudio en el mundo. Existe evidencia que confirma que en condiciones *in vitro*, el *thinner*, como mezcla compleja de solventes orgánicos induce daños en el DNA de linfocitos (Hidalgo y

Londoño, 2007). Los solventes en general son de gran volatilidad y bajo punto de ebullición (ARP-ISS, 1998), por lo que a temperatura ambiente pueden pasar del estado líquido al gaseoso y entrar en el organismo principalmente por las vías respiratorias; sin embargo, su carácter lipofílico también les permite atravesar la dermis (Löf and Johanson, 1998). En la población de estudio, otros factores determinan la toxicocinética de los solventes, incluyendo las pocas o nulas medidas de protección que minimicen el contacto con los materiales de trabajo (caretas, uniforme y guantes), además de la escasa ventilación de los talleres.

En adición, los solventes orgánicos son sustancias apolares que deben ser sometidos a reacciones metabólicas (CYP450, EPHXs) para incrementar su solubilidad y facilitar su excreción a través de la orina; dichas reacciones generan productos intermedios de mayor toxicidad que el compuesto parental (bioactivación), radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Costa *et al*, 2006; Mattia. *et al*, 1991) que pueden unirse a centros nucleofílicos del DNA a través de enlaces covalentes y originar lesiones primarias en el DNA (Heuser *et al*, 2007). La significancia biológica de estas lesiones radica en que pueden ser correctamente reparadas, reparadas incorrectamente o no reparadas. De ocurrir esto último, las lesiones se fijarán permanentemente originando mutaciones en las células somáticas y/o en las células germinales, y podrán ser el origen de problemas de salud como el cáncer (Bonassi, 2001a).

Lo anteriormente expuesto justifica con razón suficiente la necesidad de evaluar el daño genético (lesiones primarias) causado por los solventes orgánicos en los trabajadores de talleres de lámina y pintura de la ciudad de Popayán mediante un sensible biomarcador de exposición (prueba de cometa), con el propósito de determinar potenciales riesgos de padecer problemas de salud a largo plazo o cáncer y formular acciones preventivas encaminadas a la promoción de la salud y a la sustentación de una mejor calidad de vida, tanto para la población objeto de estudio como para las descendencias futuras.

La prueba de cometa ha jugado un rol muy importante en el biomonitoreo de poblaciones expuestas ambiental/ocupacional a agentes carcinogénicos y mutagénicos y ha mostrado ser una metodología muy sensible para detectar daño a nivel de células individuales, principalmente en linfocitos humanos (Albertini *et al*, 2000). De hecho, la electroforesis alcalina de células individuales tiene muchas ventajas sobre otros ensayos aplicables en la determinación de genotoxicidad. En este sentido, debe mencionarse que las pruebas de alteraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambios entre cromátidas hermanas son aplicables solamente a células proliferativas, mientras que la prueba de cometa es aplicable a cualquier tipo de célula eucariótica. (Hartmann *et al*, 2004; Kassie, *et al*, 2000). Desde la introducción de la versión alcalina (pH>13) de este ensayo por Singh en 1988 el número de aplicaciones e investigaciones en el área del biomonitoreo se ha incrementado casi exponencialmente con el tiempo, en razón de que esta versión permite detectar una gran variedad de daños en el material genético tales como: rupturas de cadena sencilla y doble

del DNA, ligamiento cruzado entre DNA-DNA/DNA-proteínas, daño oxidativo en bases nitrogenadas, sitios lábiles al álcali y sitios intermedios de reparación (incompleta) del DNA por escisión de bases o nucleótidos. (Avishai *et al*, 2001).

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa se correlacionan con otros biomarcadores de efecto tales como la frecuencia de alteraciones cromosómicas y la frecuencia de micronúcleos (Faust *et al*, 2004a Hoffmann and Speit, 2005; Godderis *et al*, 2004; Zeljezic and Garaj-Vrhovac, 2001); además, esta prueba se ha realizado conjuntamente con la genotipificación de los genes del metabolismo Glutación S-transferasa T1 y M1 (Godderis *et al*, 2004) y los genes de reparación hOGG1, XRCC1 y XRCC3 (Mateuca *et al*, 2005) demostrando una influencia de los polimorfismos de estos genes en los niveles de daño genético. En este orden de ideas, es importante mencionar que la evaluación de daño genético por la exposición a solventes orgánicos mediante el ensayo cometa se constituye en uno de los objetivos de un macro-proyecto ejecutado actualmente por el Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, que pretende correlacionar los resultados de esta prueba con las frecuencias de varios biomarcadores de exposición y efecto (intercambios entre cromátidas hermanas, alteraciones cromosómicas y micronúcleos), biomarcadores de susceptibilidad (polimorfismos en genes de reparación y metabolismo) y con la eficiencia de reparación del DNA (prueba de Challenger).

Cabe mencionar que pocos artículos de biomonitoreo han implementado el ensayo de cometa para evaluar exposición a solventes orgánicos (como mezclas complejas). Lo anterior es comprobable a través de la búsqueda de bibliografía en grandes bases de datos como PubMed y ScienceDirect, en las que son escasos los artículos relacionados con este tipo de exposición, y más en pintores de carros. En Colombia sólo un estudio ha implementado el ensayo de cometa para la determinación de daños en el DNA en una población de fabricantes de pinturas en la ciudad de Bogotá (Bustamante *et al*, 2007); en consecuencia el aporte científico de este trabajo está dado tanto a nivel regional como nacional, pues es el primero en abordar la problemática de exposición ocupacional de los pintores de carros.

Es importante considerar que la evaluación de efectos mutagénicos mediante el ensayo cometa se ha realizado casi exclusivamente en sistemas *in vitro*; razón por la cual existe una metodología estructurada, uniforme y de validez internacional para tales propósitos. Esto se constituye en una razón de más para trabajar en el biomonitoreo de poblaciones mediante la prueba de cometa, pues los resultados obtenidos serán relevantes en el proceso conducente a la validación de esta técnica como biomarcador de exposición. Finalmente, la realización de trabajos *ex vivo* permite conocer los efectos mutagénicos de agentes tóxicos, en razón de que las exposiciones agudas y las altas dosis que se manejan en los sistemas *in vitro* e *in vivo* no reflejan la verdadera exposición ambiental/ocupacional que en la realidad

del ser humano se ve influenciada por el metabolismo, la alimentación, la edad, el género, las interacciones gen-ambiente y otros factores independientes.

La confirmación de las hipótesis planteadas con los resultados obtenidos en este estudio aporta evidencia significativa que permitirá proponer, con argumentos válidos, modificaciones en los lugares de trabajo de la población de pintores en la ciudad de Popayán, con el fin de mejorar las condiciones de ventilación de los talleres, los hábitos de higiene personal y la duración de las jornadas de trabajo. Una motivación adecuada será pilar fundamental para educar con el fin de minimizar exposiciones peligrosas a agentes genotóxicos, garantizar un ambiente de trabajo seguro y producir un impacto positivo sobre la calidad de vida, no sólo de los pintores sino también de sus familias.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar el daño en el DNA de linfocitos de sangre periférica por exposición ocupacional a pinturas y solventes orgánicos mediante el ensayo de cometa alcalino en pintores de carros de la ciudad de Popayán (Cauca).

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar una metodología óptima para la aplicación del ensayo cometa en el monitoreo de poblaciones expuestas ocupacionalmente.

Relacionar los parámetros de cuantificación de daño genético del ensayo cometa obtenidos para el grupo expuesto a solventes orgánicos y pinturas con respecto a los parámetros obtenidos en el grupo no expuesto o referente.

Determinar la relación existente entre los parámetros de cuantificación de daño genético de la prueba de Cometa y el tiempo de exposición ocupacional a los solventes orgánicos en pintores de carros de la ciudad de Popayán.

Relacionar los parámetros de cuantificación de daño genético de la prueba de Cometa con la edad de los pintores de carros de la ciudad de Popayán.

5. ANTECEDENTES

El biomonitoreo de poblaciones expuestas ocupacionalmente a químicos y carcinógenos es un área bastante explorada actualmente en el campo de la toxicología genética. Entre los principales biomarcadores (citogenéticos) utilizados para tal propósito se encuentran la frecuencia de alteraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambios entre cromátidas hermanas. Varios de estos biomarcadores han sido implementados para determinar daño genético por exposición ocupacional a solventes orgánicos, sin embargo son pocos los estudios orientados a la exposición de los pintores, y mas aún de los pintores de carros.

Silva y Mello, (1996) realizaron un estudio con 25 pintores de carros de la ciudad de Brasilia en el que se encontró una alta frecuencia, estadísticamente significativa ($p < 0.05$; prueba Mann Whitney), de aneuploidias y deleciones cromosómicas en los linfocitos de sangre periférica de los pintores de carros en relación a los sujetos control (20 individuos). También encontraron correlación entre el tiempo de exposición y la frecuencia de aneuploidias (Correlación de Kendall, $p < 0.05$). Este biomonitoreo permitió concluir a los investigadores que los individuos estudiados representan un grupo en riesgo y deben tener un seguimiento médico y reexaminaciones periódicas con el fin de evitar efectos de salud a largo plazo.

Pinto *et al*, (2000); tomaron muestras de sangre periférica y células bucales de 25 pintores de exteriores (expuestos a solventes orgánicos, pinturas con pigmentos de plomo y residuos plásticos) e igual número de controles que fueron apareados por sexo y edad con el grupo de estudio. Se determinó el nivel de plomo en las muestras de sangre de los pintores, además de la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (AC) e Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICHs). En células bucales se determinó la frecuencia de Micronúcleos (MN). Los pintores de este estudio mostraron mayores niveles de plomo en sangre que el grupo referente. La frecuencia de AC e ICHs en linfocitos y la frecuencia de MN en células bucales también fueron estadísticamente mayores en el grupo expuesto ($p < 0.05$). En conclusión, el daño citogenético fue asociado significativamente con la exposición ocupacional.

Pitarque, *et al* (2002); examinaron la frecuencia ICHs y MN en cultivos de linfocitos de 52 mujeres en oficio de zapatería (expuestas a solventes) que fueron emparejadas por sexo y edad con 36 mujeres sin exposición ocupacional. El grupo expuesto mostró tener niveles mas elevados de Acido hipúrico en orina (biomarcador de exposición a Tolueno) además de tener una frecuencia de micronúcleos significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a

las mujeres del grupo referente. Por el contrario, no se encontró diferencia entre los dos grupos y la frecuencia de ICHs.

Gajalakshmi, *et al* (2002); estudiaron la frecuencia de alteraciones cromosómicas en 104 pintores de carros y refrigeradores de la ciudad de Chennai, al sur de la India; al azar, escogieron 50 hombres sin exposición como controles del estudio. De las muestras de sangre periférica, realizaron análisis cromosómico de los linfocitos, encontrando que la frecuencia basal de alteraciones cromosómicas fue significativamente mayor ($p < 0.05$) entre los pintores en comparación con los hombres del grupo referente. El hábito de fumar y el consumo de alcohol como factores moduladores no tuvo efecto en la frecuencia de metafases aberrantes. El análisis de regresión lineal indicó que la duración o tiempo de exposición y la edad influyen significativamente la frecuencia observada de alteraciones cromosómicas.

La incursión de la prueba alcalina de cometa en la toxicología genética amplía aún más los horizontes de esta área del conocimiento pues otorga mayor sensibilidad en los análisis de daño genético. Es importante considerar que el número de estudios que relaciona las pruebas citogenéticas con el ensayo de cometa (citogenética molecular) se han incrementado considerablemente en la última década. El primer esfuerzo para la cuantificación de daño en el DNA mediante la electroforesis de células individuales fue realizado por Rydberg y Johanson en 1978, quienes al embeber células en agarosa, someterlas a lisis alcalina y realizar la tinción de las mismas con naranja de acridina; determinaron el nivel de daño en el DNA de acuerdo a los niveles de fluorescencia verde (DNA de doble hebra) o roja (DNA de hebra sencilla). Más adelante, Ostling y Johanson introducen la técnica de microelectroforesis o SCGE, bajo condiciones neutras, por lo que solo fue detectable el daño de cadena doble del DNA. La modificación de este ensayo por Singh en 1986, introduce la electroforesis alcalina, que permitió la visualización no solo de rupturas de cadena doble, sino también de cadena sencilla, sitios lábiles al álcali, ligamiento cruzado de DNA y sitios incompletos de reparación por escisión. (Kassie *et al*, 2000). Es importante resaltar que actualmente la prueba de cometa tiene aplicaciones en el área médica, pues se relaciona con la sensibilidad a la radioterapia en el cáncer de vejiga (Moneef *et al*, 2003).

Plappert *et al*, (1994), aplicaron la prueba de cometa para análisis *ex vivo* de ratones expuestos a Benceno y Tolueno, o co-expuestos a los dos solventes orgánicos. Los resultados obtenidos confirman la reducción de la toxicidad del Benceno por el Tolueno. Este efecto protector fue más pronunciado cuando los daños en el DNA eran estudiados en células de sangre periférica, médula ósea e hígado, a través del ensayo cometa.

Pitarque *et al*, (1999a), determinaron daños en el DNA evaluado mediante la prueba cometa y la presencia de genotipos de riesgo de los genes GSTT1-GSTM1 en un grupo de mujeres

ocupacionalmente expuestas a solventes orgánicos (principalmente el tolueno), empleadas en una industria de calzado. El grupo expuesto fue constituido por 34 mujeres, y el grupo control por 19. En este estudio, no se presentaron diferencias significativas de los parámetros de cometa (Momento de Cola y Porcentaje de DNA en la Cola de los linfocitos) entre las mujeres expuestas y las del grupo control. El habito de fumar, el genotipo GSTT1-M1 (presente o nulo) no fue asociado con el daño en el DNA.

Iravathy *et al*, (2001), trabajaron con linfocitos de sangre total, para determinar el daño genético por exposición ocupacional a maquinas fotocopiadoras, principalmente a los *toners* de las mismas, que contienen, entre otras sustancias, hidrocarburos policíclicos aromáticos. Las muestras de sangre fueron extraídas de 29 hombres, con una jornada de trabajo superior a 8 horas y con más de un año de exposición a fotocopiadoras. Los controles (26 en total) fueron apareados por edad y estatus socio económico. Se observó un incremento significativo del daño basal del DNA y una disminución en la eficiencia de reparación para el grupo expuesto en relación con el grupo control.

Zhu and Jiang, (2001), estudiaron el efecto de la exposición ocupacional a Benceno, Tolueno, Xileno y humo de soldadura y evaluaron la influencia del habito de fumar y el consumo de alcohol en el daño genético de los linfocitos humanos en fabricantes de autobuses de China. En este estudio se incluyeron 346 expuestos (106 mujeres y 240 hombres) divididos en seis categorías: soldadores, mecánicos, pintores, ensambladores y personas con cargos administrativos; todos trabajadores de la planta de fabricación de buses; 40 personas sanas y no expuestas conformaron el grupo control. Los autores concluyeron que la exposición ocupacional ($P=0.001$) y el habito de fumar ($P=0.019$) tienen un efecto significativo sobre el incremento del Momento de Cola; y que las ocupaciones de mayor riesgo (por sus elevados parámetros de cometa) son los pintores ($p=0.002$) y los mecánicos ($P=0.044$)

Roth *et al*, (2003); aplicaron la prueba de Micronúcleos y el ensayo cometa en células de mucosa bucal para evaluar el riesgo asociado con la exposición ocupacional de 10 renovadores de baterías y 10 pintores de carros; emparejados por edad con un grupo referente. La exposición en ambos grupos fue asociada significativamente con un incremento en la frecuencia de micronúcleos y la longitud e índice de daño de los cometas ($p<0.001$).

Sul *et al*, (2003), investigaron los efectos en el DNA de los hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante la prueba de cometa en linfocitos B, T y granulocitos. Los sujetos de estudio fueron: 24 hombres provenientes de compañías de inspección de emisión de gases y 28 provenientes de compañías de incineración de basuras. Todos fueron apareados por edad con 43 controles sanos y no expuestos a solventes orgánicos. El daño genético fue determinado mediante el Momento de Cola Olive y el Porcentaje de DNA en la Cola.

Dichos valores fueron significativamente mayores en el grupo expuesto con relación al grupo control. Es de resaltar que el daño genético de los linfocitos B fue mucho mayor que el daño en linfocitos T. Ningún parámetro de cometa, fue asociado significativamente con la edad o el hábito de fumar. Este estudio permitió concluir que los linfocitos B son células muy sensibles a la exposición por benceno y se les recomienda como buenas herramientas para el biomonitoreo de poblaciones expuestas a solventes orgánicos.

Heuser *et al*, (2005), Obtuvieron muestras de sangre de zapateros brasileros (todos hombres) expuestos a adhesivos a base de agua (WBA) o a base de solventes (SBA), con el fin de determinar diferencias en el daño genético causado por cada clase de material. Para tal propósito, se emplearon 29 sujetos expuestos a WBA y 16 a SBA. Se utilizaron 25 controles sanos de edad comparable. Como biomarcadores de daño genético por exposición a solventes orgánicos se emplearon el ensayo de cometa y la prueba de micronúcleos. La concentración de ácido hipúrico (metabolito del tolueno) también fue determinada, siendo significativamente menor en el grupo control. Los resultados de la prueba de cometa mostraron un incremento significativo de daño genético en los trabajadores con adhesivos a base de solventes ($P=0.001$) en comparación con los del grupo WBA. La prueba de micronúcleos en células binucleadas no mostró diferencias significativas entre los grupos expuestos y control. Este estudio demuestra, que los adhesivos a base de agua son una mejor opción de trabajo y deben ser implementados con el fin de disminuir riesgos de salud.

Sul *et al*, (2005), determinaron el daño en el DNA (Momento de Cola Olive) de linfocitos de trabajadores expuestos al benceno y su correlación con los niveles de ácido mucónico (metabolito del benceno). La población objeto de estudio fue conformada por 61 trabajadores de Corea del Sur (no se menciona cuantos sujetos conformaron el grupo control). Los trabajadores del grupo expuesto fueron obtenidos de 6 diferentes ocupaciones (zapateros, industria de impresión, producción de nitrobenceno, carcomer, metileno di-anilina y benceno). Se pudo apreciar un daño genético dependiente de la dosis cuando los niveles de exposición a solventes orgánicos (benceno) eran muy elevados. El daño en el DNA se correlacionó con los niveles de ácido mucónico en la orina.

Swanepoel *et al*, (2005), evaluaron el daño genético y la eficiencia de reparación en linfocitos de trabajadores expuestos a solventes orgánicos mediante la prueba alcalina de cometa. La muestra de estudio fue conformada por 27 personas expuestas al benceno y 9 personas no expuestas y saludables. También determinaron la concentración del ácido mucónico (metabolito del benceno) por medio de cromatografía líquida (HPLC). Las muestras de sangre fueron tomadas dos veces en el día, antes y después del turno de trabajo. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias entre los parámetros de cometa (momento de cola y % DNA en la cola) de las muestras tomadas antes del turno y después del turno. En general, los datos de daño genético obtenidos para las muestras tomadas post-turno de trabajo exceden considerablemente los datos de las muestras pre-turno. La reparación del DNA fue un 9% mayor en las muestras tomadas antes del turno en

comparación a las tomadas después del turno. Finalmente, los niveles del ácido mucónico, fueron significativamente mayores en los expuestos que en los controles.

Roma-Torres *et al*, (2006), evaluaron el efecto genotóxico de la exposición ocupacional a Benceno, Tolueno y Xileno (B.T.X) en trabajadores de una refinería de petróleo en Portugal. El grupo expuesto fue conformado por 48 trabajadores apareados por edad y otros factores de confusión con 30 controles saludables. El daño genético fue evaluado mediante las pruebas de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y el ensayo cometa en linfocitos T, además se determinaron las concentraciones en orina de los metabolitos ácido mucónico, ácido hipúrico y ácido metil hipúrico. Los resultados muestran un incremento estadísticamente significativo de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y parámetros de cometa (Longitud de la Cola) en el grupo expuesto en relación con el grupo control. Así mismo, un incremento significativo del ácido mucónico fue encontrado para el grupo expuesto. Los biomarcadores de efecto utilizados en este estudio no fueron asociados con el hábito de fumar. La frecuencia de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos fue asociada positivamente con la edad.

La exposición ocupacional a solventes orgánicos en diferentes grupos de trabajo ha sido evaluada mediante el ensayo alcalino cometa para determinar genotoxicidad. El oficio de la zapatería es el más documentado y está asociado con exposición rutinaria a Hexano, Tolueno y Benceno (Heuser *et al*, 2005; 2007; Pitarque *et al* 1999a). Otros oficios como refinerías de petróleo (Torres-Roma 2006), Fotocopiadores (Iravathy *et al*, 2001), y exposición rutinaria a solventes aislados -Benceno, Tolueno, Xileno- (Sul *et al*, 2005, Swanepoel *et al*, 2005; Zhu and Jiang, 2001) también aportan información acerca de la exposición a estas sustancias. Estudios de daño genético por exposición ocupacional en pintores de carros mediante el ensayo cometa son muy pocos; conociéndose solamente dos publicaciones importantes realizadas por Zhu *et al* (2001) y Roth *et al* (2003); sin embargo ambos estudios no discriminan los diferentes escenarios de trabajo de los pintores que, en adición a la exposición a solventes, se encontraban expuestos a metales pesados de la soldadura. En segundo lugar, el pequeño número de muestra del estudio de Roth *et al* (2003) (n=10) podría no reflejar la realidad de la exposición, si se tiene en cuenta que la unidad de muestreo en el ensayo cometa no es la célula sino el individuo. Estas falencias fueron superadas en el estudio realizado, pues se incluyeron 60 participantes divididos en 2 grupos de trabajo y la exposición ocupacional a otras agentes químicos o físicos; así como otros tipos de exposición (cigarrillo, alcohol, medicamentos) fueron registradas mediante la aplicación de encuestas y tomadas como parámetros de exclusión.

Tabla 1. Resumen de Antecedentes

AUTOR	Oficio y/o agente de exposición	N	Parámetros de cometa	Otros biomarcadores	Resultado
Silva y Mello, (1996)	Pintores de carros	Ex: 25 Rf: 20	-	Frecuencia de aneuploidias	Diferencia entre grupos; , p<0.05
Pinto <i>et al</i> , (2000)	Pintores de exteriores	Ex: 25 Rf: 25	-	Nivel de plomo / sangre (AC), (ICHs). (MN)	AC, ICHS, MN, mayor en grupo expuesto (p<0.05)
Pitarque, <i>et al</i> (2002)	Zapatería	Ex: 52 Rf: 36	-	- ICHs y MN - Acido hipúrico	MN, Acido Hipúrico diferencia entre grupos (p<0.05).
Gajalakshmi, <i>et al</i> (2002)	Pintores de carros y refrigeradores	Ex: 104 Rf: 50	-	AC	AC mayor, (p<0.05) en pintores
Pitarque <i>et al</i> , (1999a)	Zapatería (Tolueno)	Ex: 34 Rf: 19	Momento de Cola y % de DNA Cola	GSTT1-GSTM1	TM y % DNA y no asociado con exposición (p<0.05)
Iravathy <i>et al</i> , (2001)	Maquinas fotocopadoras; <i>tonners</i>	Ex: 29 Rf: 26	Daño basal DNA	-	Daño en el DNA no asociado con exposición (p<0.05)
Zhu and Jiang, (2001),	Benceno, Tolueno, Xileno y humo de soldadura	Ex: 346 Rf: 40	Momento de Cola	-	TM mayor en pintores (p<0.002)
Roth <i>et al</i> , (2003);	Renovadores de baterías y pintores de carros	Ex: 10 Rf: 10	Índice de daño de cometas	MN	Daño DNA mayor en pintores (p<0.001).
Sul <i>et al</i> , (2003),	Solventes orgánicos	Ex: 52 Rf: 43	Momento de Cola Olive y % DNA en la Cola	-	OTM, %DNA cola mayor en expuestos (p<0.05).
Heuser <i>et al</i> , (2005)	Zapatería, Tolueno	Ex: 16 Rf: 25	Grado visual de daño	MN.y ácido hipúrico	Daño DNA mayor en expuestos (p<0.05).
Sul <i>et al</i> , (2005),	Benceno	Ex: 61 Rf: NR	Momento de Cola Olive	Ácido mucónico	OTM mayor en expuestos (p<0.05).
Swanepoel <i>et al</i> , (2005),	Benceno	Ex: 27 Rf: 9	Momento de cola y % DNA cola	Ácido mucónico	TM y % DNA cola mayor en expuestos (p<0.05).
Roma-Torres <i>et al</i> , (2006),	Refinería de petróleo. Benceno, Tolueno y Xileno	Ex: 48 Rf: 30	Longitud de la Cola	MN, AC, ácido mucónico	Longitud de cola mayor en expuestos (p<0.05).

6. MARCO TEORICO

6.1. SOLVENTES ORGÁNICOS

Son sustancias químicas (hidrocarburos) basadas en el elemento carbono utilizadas en la disolución de compuestos orgánicos (pinturas, resinas), como sustancias desengrasantes y en la síntesis de productos industriales, químicos y farmacéuticos. Pueden utilizarse solos o en combinación con otras sustancias (que también pueden ser solventes), en este caso sus mayores aplicaciones se dan como agente adhesivo, plastificante y en la fabricación de pinturas (ARP-ISS, 1998).

6.1.1. Clasificación. Los solventes orgánicos pueden clasificarse como saturados e insaturados o de acuerdo a su estructura química espacial en alifáticos, cíclicos, aromáticos y mixtos (ARP-ISS 1998).

6.1.2. Características de los solventes orgánicos. En primera instancia todos los solventes orgánicos se presentan en estado líquido. Son sustancias de bajo peso molecular, elevada presión de vapor¹ (aumenta la volatilidad), apolares o poco polares, los vapores que desprenden son inflamables y su densidad es mayor que la del aire (ARP-ISS, 1998).

6.1.3. Aplicaciones económicas de los solventes orgánicos. Los solventes orgánicos son ampliamente utilizados en la industria principalmente en procesos involucrados con la fabricación de materiales (productos de cuero, caucho, pinturas, aerosoles, barnices, lacas, pegantes, adhesivos, colorantes, perfumes, plaguicidas, drogas) y la transformación de materias primas. También son utilizados en la síntesis de productos químicos, lavado en seco de materiales, petroquímica, entre otras (ARP-ISS 1998). No debe desconocerse que la exposición a este tipo de compuestos químicos también se presenta en el hogar, pues muchos productos de uso diario (limpieza, belleza) los contienen.

¹ Capacidad que posee un líquido de pasar al aire como vapor

6.2. GENERALIDADES DE ACUMULACIÓN Y TOXICIDAD DE LOS SOLVENTES

La toxicidad de los solventes orgánicos está determinada por la dosis del mismo que tendrá efecto en un tejido blanco, por lo tanto la magnitud del efecto tóxico (citotóxico-genotóxico) se incrementa a medida que aumenta la dosis y el tiempo de exposición (Löf and Johanson, 1998). Los solventes pueden ingresar al cuerpo por varias vías de exposición; respiración, consumo oral y absorción dérmica. Dado el carácter volátil de estas sustancias, se considera la inhalación como principal vía de exposición ocupacional. La absorción oral esta limitada al consumo de bebidas alcohólicas o a la ingesta accidental de un solvente. La exposición por vía dérmica también está influenciada por la volatilidad de los solventes pues a medida que esta disminuye aumenta la posibilidad de absorción de los solventes a través de la piel (por difusión) (Löf and Johanson, 1998). El incremento en la liposolubilidad de un solvente orgánico determinará la capacidad de bioacumulación de los mismos. Por ello la toxicidad ejercida por los solventes orgánicos es mayormente de carácter neurotóxico pues tienden a acumularse en el tejido graso, especialmente en el sistema nervioso central (ARP-ISS 1998).

6.3. LA PINTURA

Son sustancias utilizadas para dar color. En su forma más simple, la pintura es la mezcla de un pigmento con un vehículo o una parte líquida.

6.3.1. Componentes de la pintura. En primera instancia están los componentes líquidos o el vehículo de la pintura, que está conformado por el aglutinante (resinas, aceites y polímeros) y un disolvente. En segunda instancia están los componentes sólidos o específicamente los pigmentos (sustancias que proporcionan el color a la pintura).

En sí, la pintura es el resultado de mezclar un pigmento con un aglutinante cuya función es proporcionar un medio fluido y formar la película que se adhiere a la superficie como protección o cobertura (por ejemplo, el aceite de linaza es un buen aglutinante ya que se solidifica al contacto con el aire). El pigmento que siempre se encuentra disperso en el medio fluido da a la película terminada su color. El disolvente o diluyente es utilizado para modificar la viscosidad de los aglutinantes y se evapora una vez extendida la pintura (Niño y Camargo, 1999). Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2001) los principales solventes orgánicos que pueden encontrarse en las pinturas son: el Xileno, Metanol, Tolueno, cloruro de metileno, Metil etil cetona, 1,1,1 Tricloroetano, Acetona, Metil isobutil cetona, entre otros.

6.4. EL THINNER

En la industria de pinturas los solventes que están en la capacidad de solubilizar los aglutinantes (resinas), son denominados solventes activos o verdaderos, para distinguirlos de aquellos que no la disuelven, pero no obstante deben ser incorporados en la formulación de las pinturas (denominados diluyentes o no solventes). Las mezclas de solventes verdaderos, cosolventes y diluyentes conforman lo que se denomina *thinner* o adelgazador (Niño y Camargo, 1999).

6.4.1. Componentes del *thinner*. En primer lugar se encuentran los solventes activos o disolventes que son líquidos volátiles, muy polares y capaces de disolver resinas sintéticas. Entre los principales solventes de este tipo se encuentran: ésteres, cetonas, éteres de glicol, Acetato de etilo, Acetato de amilo, Acetato de propilo, acetona, metil-etil cetona y metil-isobutil cetona (los últimos son los más usados en la industria del *thinner*). En segundo lugar los cosolventes o específicamente alcoholes, son de gran importancia en la fabricación del *thinner* y son sustancias que no tienen la capacidad de disolver las resinas. Los más comúnmente utilizados son el alcohol isopropílico, alcohol n-propílico, isobutanol, n-butanol, alcohol metílico, alcohol amílico y el alcohol etílico. Un tercer componente son los diluyentes ó hidrocarburos y parafinas que no tienen ningún poder disolvente sobre resinas sintéticas, sin embargo pueden actuar sobre resinas naturales. Su utilización en la fabricación del *thinner* otorga ciertas características específicas (fluidez, peso, viscosidad) a la sustancia resultante y además reduce costos en la fabricación del mismo. Los diluyentes utilizados en el *thinner* son el Tolueno, varias conformaciones del Xileno y el Benceno. Finalmente, los retardadores son sustancias que determinan la velocidad de evaporación de la pintura, evitando inconvenientes en el manejo de esta (secado muy rápido). El retardador de más uso en *thinner* es el butil cellosolve. (Niño y Camargo, 1999).

Tabla 2. Proporción de las sustancias que conforman el *thinner*

Sustancia	Proporción en la pintura
Disolvente activo	16 – 22 %
Cosolvente	12 – 16 %
Retardador	3 – 9 %
Diluyente	55 – 60 %

Fuente: Caracterización del *thinner* para la industria de pinturas de uso domestico en Santafé de Bogota D.C. Trabajo de grado: Niño y Camargo., 1999.

6.5. MONITOREO BIOLÓGICO

Es el conjunto de actividades realizadas en forma sistémica y repetitiva encaminadas a desarrollar acciones correctivas y preventivas (Hoyos *et al*, 2002). El monitoreo biológico se sustenta en la aplicación de biomarcadores de efecto que permiten cuantificar daños o efectos tempranos que son predictivos de enfermedad o problemas de salud. Entre los principales biomarcadores de efecto están la prueba de alteraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas y la prueba de micronúcleos.

“El conocimiento acerca de los riesgos de salud en una población expuesta puede ser usado como una guía para extrapolar a otras poblaciones expuestas de forma similar”(Au, 1991)

6.6. BIOMARCADORES

Son indicadores de eventos tempranos en muestras o sistemas biológicos desarrollados para evaluar exposición, efectos precoces y susceptibilidad de los individuos y poblaciones que se encuentran en contacto con agentes tóxicos peligrosos. Son predictores de riesgos de salud por exposición ambiental/ocupacional, ayudan a entender la etiología de las enfermedades, identificar individuos susceptibles y a desarrollar estrategias de intervención para reducir los riesgos de adquirir una enfermedad en el lugar de trabajo. El termino biomarcador es utilizado en un amplio sentido e incluye cualquier medida que refleje interacción entre un sistema biológico y un agente ambiental, físico, químico o biológico (Hoyos, 2006). Actualmente los biomarcadores de efecto que indican exposición a agentes tóxicos son numerosos y se basan en la determinación de daños en el DNA como rupturas, alteración de bases, formación de aductos, alteraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambios entre cromátidas hermanas (Faust *et al*, 2004b), que también son el resultado de daños en el DNA (Kassie *et al*, 2000).

En los últimos años la versión alcalina del ensayo cometa se ha convertido en una importante herramienta en estudios de biomonitoreo para detectar daño genético en poblaciones expuestas. (Faust *et al*, 2004a), pues permite detectar una amplia variedad de lesiones en el DNA como rupturas de cadena sencilla y doble del DNA, ligamientos cruzados DNA-DNA o DNA-proteínas, daño oxidativo de bases nitrogenadas, sitios lábiles al álcali y sitios donde se lleva a cabo la reparación del DNA (Tice *et al*, 2000). La prueba de cometa también se distingue por ser sencilla, rápida, económica y efectiva (Avishai *et al*, 2003).

6.7. ENSAYO COMETA Ó ELECTROFORESIS EN MICROGEL DE CELULAS INDIVIDUALES.

La electroforesis alcalina de células individuales también es conocida como ensayo cometa en razón a que las células que poseen daño genético muestran la forma de un cometa luego de haber sido sometidas a la electroforesis (Konca *et al*, 2003).

Rydberg y Johanson (1978) fueron los primeros en cuantificar daños en el DNA de células individuales mediante una técnica novedosa que requería de embeber las células en agarosa y lisarlas en condiciones alcalinas para permitir el desenrollamiento del DNA en sitios de ruptura inducidos por agentes químicos o físicos. Después de una neutralización el nucleóide resultante era teñido con naranja de acridina para revelar la cantidad de DNA dañado a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por las células mediante un fotómetro (Rojas *et al*, 1999). A menor daño genético, la fluorescencia era predominantemente verde, mientras que la fluorescencia roja era indicio de rupturas en el DNA. Lo anterior obedece a que después de la desnaturalización del material genético existen varios fragmentos ligeros de DNA (si existió daño genético) que facilitan el intercalamiento con las moléculas de naranja de acridina. Contrariamente el DNA intacto no está presto a la polimerización por el colorante en razón al elevado peso molecular y continuidad de sus hebras. (Singh, 1996).

Para mejorar la sensibilidad en la detección de daños del DNA de células aisladas, Ostling y Johanson (1984) desarrollaron la técnica de electroforesis en microgel; comúnmente conocida como ensayo cometa. En el desarrollo de esta técnica, células de linfoma expuestas a rayos Gamma fueron embebidas en geles de agarosa y lisadas con detergentes y sales en altas concentraciones. El DNA liberado fue sometido a electroforesis en condiciones neutras y posteriormente teñido con bromuro de etidio. Esta técnica solo permitió la detección de rupturas de cadena doble del DNA y la presencia de RNA en los geles fue motivo de discusión.

Dos versiones del ensayo cometa se utilizan actualmente, una introducida por Singh quien implemento la electroforesis en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) pudiendo detectar rupturas de cadena sencilla del DNA y sitios lábiles al álcali en las células. Esta versión se conoce como “electroforesis en gel de células individuales”, aunque por razones históricas se ha referido esta técnica como ensayo cometa. Subsecuentemente, Olive y colaboradores (1990) desarrollaron varias modificaciones de la versión neutra de Östling y Johanson (1984) que involucra la lisis celular alcalina seguida de una electroforesis, bien sea neutra o a un pH de 12.3 para detectar rupturas de cadena sencilla. Los métodos de Singh y Olive son idénticos en principio y similares metodológicamente, sin embargo la metodología de Singh parece ser mas sensible (Rojas *et al*, 1999).

En la versión de Singh, las células individuales son suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión y embebidas entre 2 capas de agarosa de punto de fusión normal formando un sándwich sobre placas portaobjetos. Las células son lisadas con detergentes y sales en altas concentraciones (pH de 10) para luego ser sometidas a electroforesis alcalina durante un corto periodo de tiempo. La lisis remueve todos los contenidos celulares, excepto por el material genético nuclear que permanece altamente superenrollado en la presencia de algunas proteínas no histonas, pero cuando este es sometido a condiciones alcalinas severas se desenrolla en los sitios de ruptura (Collins *et al*, 1997). Las células con mayores daños genéticos exhibirán una mayor migración del DNA desde el nucleóide a través del ánodo, bajo la corriente eléctrica de la cámara electroforesis, dando la apariencia de la cola del cometa (Rojas *et al*, 1999). Singh estableció el uso de placas esmeriladas (para prevenir el desprendimiento de los geles) y la tinción con bromuro de etidio. En su esfuerzo por mejorar la técnica implementó un tinte de fluorescencia más intensa, el YOYO-1 y añadió sustancias antioxidantes durante la electroforesis para prevenir la formación de radicales libres que pudieran incrementar los niveles de daño genético. Para lograr mayor sensibilidad en el ensayo neutro de cometa, aplicó tratamientos a los microgeles con ribonucleasa A y proteinasa K, con el fin de obtener un DNA de alta pureza, libre de RNA (Singh, 1996).

Actualmente, la técnica de Singh, ha sido adoptada por varios laboratorios y es modificada según las necesidades de investigación (Faust *et al*, 2004b). Una de las adaptaciones más interesantes del ensayo cometa, involucra la digestión del DNA con enzimas específicas de lesión. La endonucleasa III, por ejemplo, reconoce pirimidinas oxidadas (Angelis *et al*, 1999). De esta forma se incrementa la sensibilidad de la técnica, ya que está en capacidad de revelar (como un incremento en la fluorescencia del cometa) daños puntuales o cambios de una sola base.

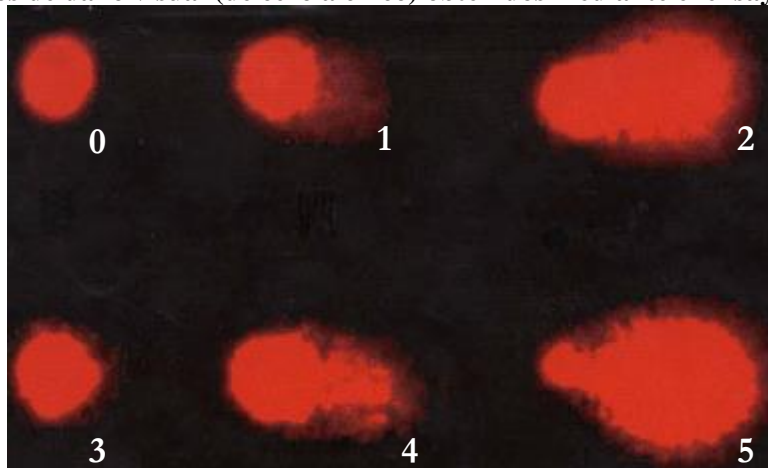
6.7.1. Parámetros de medición de daño genético de la prueba Cometa. Aunque la metodología del ensayo cometa es sencilla, el análisis de imágenes para la cuantificación de daños en el DNA no es tan simple (Konca *et al*, 2003). Actualmente existen varias metodologías para el registro y determinación de daños en el DNA. La primera de ellas consiste en determinar por micrometría la longitud total de los cometas, desde la cabeza hasta el último punto de fluorescencia de la cola. Los cometas también pueden agruparse en categorías de daño visual que van desde 0 ó sin daño hasta 5 ó daño total. Aunque estas metodologías han sido implementadas extensivamente en varios estudios no son muy precisas pues dependen de la subjetividad del investigador.

Una forma más precisa de analizar las imágenes de los cometas es a través de paquetes computacionales. En este estudio se trabajó con el software CASP 3.1, disponible gratuitamente por Internet (<http://www.casp.of.pl>) y desarrollado para el dominio público de investigadores de laboratorio (Konca *et al*, 2003). Este programa trabaja con imágenes en formato TIFF de cometas fluorescentes; reconoce como punto de mayor intensidad

fluorescente la cabeza del cometa y determina a partir de esa medida original una gran cantidad de valores numéricos de cuantificación de daños en el DNA.

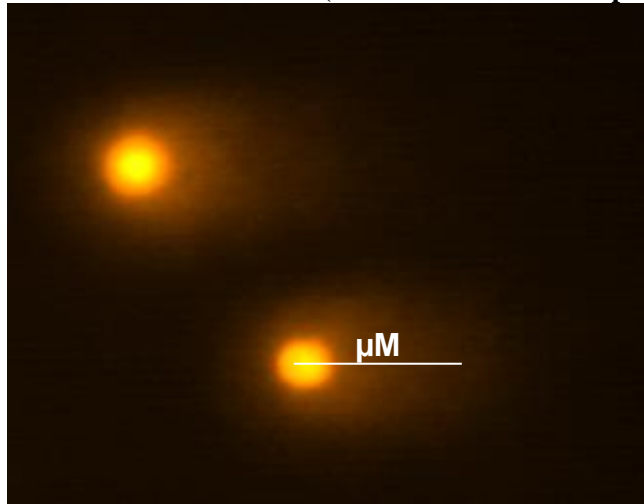
- **DNA de la cabeza:** Cantidad de DNA en la cabeza
- **DNA de la cola:** Cantidad de DNA en la cola
- **% de DNA de cabeza:** Porcentaje de DNA en la cabeza del cometa
- **% de DNA de cola:** Porcentaje de DNA en la cola del cometa (Utilizada en el trabajo).
- **Radio de cabeza:** Radio de la cabeza del cometa
- **Longitud de la cola:** Longitud de la cola del cometa medida desde el borde derecho del área de la cabeza hasta el final de la cola. (Utilizada en el trabajo)
- **Longitud del cometa:** Longitud del cometa entero desde el borde izquierdo de la cabeza hasta el final de la cola.
- **Media X de la cabeza:** Centro de gravedad del DNA en la cabeza.
- **Media X de la cola:** Centro de gravedad del DNA en la cola
- **Momento de cola:** % DNA en la cola **X** Longitud de la cola. (utilizada en el trabajo).
- **Momento de cola Olive:** % DNA en la cola **X** (Media X de cabeza – Media X de la cola).

Figura 1. Grados de daño visual (de cero a cinco) obtenidos mediante el ensayo cometa



Fuente: Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato (Monroy *et al*, 2005)

Figura 2. Longitud micrométrica del cometa (núcleo hasta el último punto de fluorescencia)



Fuente: Programa CASP. Imágenes de demostración.

6.7.2. Principio biológico del ensayo de Cometa. Las imágenes obtenidas mediante la tinción fluorescente de los núcleos celulares son de morfología característica; están formadas por una cabeza y una cola que en conjunto, dan lugar a la imagen de un cometa. Estas imágenes son interpretadas bajo la siguiente premisa: Los daños en el material genético causados por un agente genotóxico ya sea de forma directa (a través de rupturas) o indirecta (generación de sitios de reparación y formación de sitios lábiles al álcali) darán lugar a la formación de hebras ligeras de DNA que serán liberadas del núcleo durante las fases de lisis y desenrollamiento alcalino. Son estos fragmentos pequeños los que producirán la cola del cometa durante la electroforesis, mientras que las grandes hebras de DNA (no dañado) no migrarán durante este proceso y formarán la cabeza del cometa; de mayor intensidad fluorescente. Por lo anterior, entre mas daño tenga el DNA mas grande será la cola del cometa y serán más elevados los parámetros de cuantificación de daño de la prueba (Choucroun *et al*, 2001).

6.7.3. Significancia biológica del ensayo de Cometa. El ensayo de Cometa permite la cuantificación de lesiones primarias del DNA causadas por un agente genotóxico en cualquier tipo de célula eucariótica. Dicho daño puede ser reparado (reparación directa, escisión de bases o nucleótidos) mal reparado o no reparado. La afectación o ausencia de los sistemas de reparación trae como consecuencia el daño permanente o mutación del material genético, bien sea a nivel de células germinales o somáticas. Las implicaciones en la salud humana producto de la mutación del DNA son bien conocidas, a nivel de células somáticas se presenta el desarrollo de cáncer y la aceleración de procesos celulares como el envejecimiento y a nivel de células germinales el daño permanente del material genético se asocia con malformaciones, esterilidad y abortos espontáneos. Es evidente entonces, la importancia de la aplicación de la prueba de cometa en poblaciones expuestas ocupacionalmente, pues puede establecerse el riesgo temprano de enfermedades con el propósito de formular acciones correctivas que propendan por la promoción de la salud.

7. METODOLOGIA

Aunque es válido afirmar que las aplicaciones del ensayo cometa en el monitoreo biológico de poblaciones expuestas ocupacionalmente son ilimitadas, el número de artículos publicados en este marco son muy pocos, siendo predominantes los estudios realizados *in vitro* e *in vivo*. En consecuencia fue necesaria la realización de una detallada revisión bibliográfica de las publicaciones mas relevantes en el monitoreo biológico con el fin de comparar procedimientos y condiciones del ensayo cometa para estandarizar un protocolo que se constituyó como base para la realización de este estudio. La metodología que se presenta a continuación, es el resultado del análisis de 7 publicaciones (Pitarque *et al*, 1999a; Iravathy *et al*, 2001; Zhu and Jiang, 2001; Ülkü and Nursen 2002; Piperakis *et al*, 2003; Alok *et al*, 2005; Swanepoel *et al*, 2005), recoge en sí los aspectos más relevantes de la prueba alcalina del cometa y se enriquece de las recomendaciones hechas por los autores en cada uno de los artículos.

7.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un monitoreo biológico tipo *cross-sectional* (Moller *et al*, 2000) en pintores de carros de la ciudad de Popayán expuestos a pinturas y solventes orgánicos. El biomarcador de exposición empleado fue el nivel de daños en el DNA (lesiones primarias) detectadas a través del ensayo cometa.

7.2. QUÍMICOS O REACTIVOS

Los químicos empleados en este proyecto de investigación fueron: Agarosa de bajo punto de fusión LMA (SIGMA A9414), Agarosa de punto de fusión normal NMA (SIGMA A6877), Ácido etilenediaminetetraacético EDTA (SIGMA E5134), Bromuro de Etidio (SIGMA E7637), Tris-HCl 1 m (SIGMA T3038), Triton x-100 (SIGMA X100), Trizma base (SIGMA T6066), Dimetil sulfoxido DMSO (SIGMA D8779), Cloruro de sodio (SIGMA S9625), Lauril sarcosinato de sodio (SIGMA L5125), Hidróxido de sodio (SIGMA S8045), Acido clorhídrico al 37% (Mallinck HX0603-3), Medio RPMI (SIGMA R8758), Trypan Blue (SIGMA T6146), Histopaque (SIGMA 1077-1) y PBS libre de Ca y Mg (SIGMA P3813) y porporcionados por el grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca.

7.3. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio fue conformada por 30 hombres sanos de edad adulta, pintores de carros de la ciudad de Popayán y expuestos a solventes orgánicos y pinturas.

7.4. SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Se diseñaron dos tipos de encuestas, una sintética o corta (ver Anexo A) que fue aplicada a 100 trabajadores de talleres de lámina y pintura de la ciudad de Popayán. La información obtenida a partir de esta intervención permitió “preseleccionar” a aquellos sujetos que posiblemente podrían ser parte del estudio (previo establecimiento de criterios de inclusión y exclusión). Estos preseleccionados fueron encuestados nuevamente por medio de un cuestionario más estructurado (Ver Anexo B) que involucra aspectos personales, familiares, de salud y relacionados con el ambiente de trabajo. A partir de esta información se conformaron los 2 grupos de estudio; expuesto y referente. La aplicación de las encuestas se realizó de forma tal, que el entrevistado pudiera decidir su participación voluntaria en las mismas y que en ningún momento se le sintiera obligando a brindar información.

Se diseñó también un Consentimiento Informado (ver Anexo C). Este documento fue firmado por las personas que hicieron parte material del estudio (tanto expuestos como referentes) como prueba de que la toma de muestras biológicas fue realizada en condiciones asépticas y con el aval del participante. Así mismo el consentimiento informado fue pertinente en advertir acerca de los posibles riesgos en el proceso de la toma de muestras de sangre. Por demás, este documento contiene la información más relevante del estudio a realizar, el destino de las muestras biológicas otorgadas, la importancia del estudio y su impacto social; con el fin de que al leerlo, las personas en cuestión decidieran si el trabajo a realizar (monitoreo) merecía su colaboración.

7.5. GRUPOS DE ESTUDIO

Entre los principales **parámetros de inclusión** para el grupo expuesto se consideraron: personas de sexo masculino, tiempo de trabajo o exposición a solventes orgánicos igual o superior a 5 años, buen estado de salud, contestar el cuestionario en la segunda entrevista, lectura y firma del consentimiento informado y disposición para donar 5mL de sangre por venipunción. Los **parámetros de exclusión** para este mismo grupo fueron: no desear participar en el estudio, ser fumador o ex – fumador, haber consumido cualquier tipo de drogas psicoactivas, haber estado expuesto a radiaciones, padecido de hepatitis, estar sometido a un tratamiento medico prolongado recientemente, tener (o haber tenido) exposición a otra clase de sustancias carcinogénicas, tales como asbestos, residuos de la

combustión del carbón, entre otros y presentar antecedentes de cáncer y malformaciones o síndromes genéticos en familiares consanguíneos. El consumo de alcohol fué registrado en frecuencia diaria, semanal, y mensual; y se excluyeron las personas que reportaron un consumo de alcohol mas frecuente que una vez al mes o “consumo social”.

El grupo referente fué seleccionado bajo los mismos parámetros que el grupo expuesto, con la única excepción de que estas personas no debían estar o haber estado expuestas a solventes orgánicos. Dado que este estudio es de tipo *cross-sectional*, se trabajó “emparejando” una persona expuesta con su respectivo control, ajustando entre ellos la edad y condición socioeconómica con el fin de eliminar sesgos en los datos que serán obtenidos.

7.6. TIPO DE VARIABLES

Tabla 3. Tipo de Variables del estudio

Factores	Grupo	Nombre de la Variable	Tipo de variable	Naturaleza	Nivel de medición	Valores Categorías	Estadística de resumen	Indicador
Tiempo		Tiempo de exposición a solventes	Independiente	Cuantitativa	Razón	Continua por años	Todas las existentes	
Edad		Años	Independiente	Cuantitativa	Razón	Años	Todas las existentes	
Sexo	Masculino	Sexo	Independiente	Cualitativa	Nominal	Hombre	Contar, porcentaje, frecuencia relativa	Masculino = 1
	Femenino	Sexo	Independiente	Cualitativa	Nominal	Mujer	Contar, porcentaje, frecuencia relativa	Femenino = 2
Grupo	Expuesto		Independiente	Cualitativa	Nominal			Expuesto = 1
	No expuest.		Independiente	Cualitativa	Nominal			No expuest=2
ANTECEDENTES PERSONALES								
Oficio	Pintor de Carro			Cualitativa	Nominal			Si = 1 No = 2
FACTORES DE CONFUSIÓN								
Factor de confusión	Alcohol	Consumo de alcohol	Desconcertante	Cuantitativa	Nominal		Contar, porcentaje, frecuencia relativa	Si = 1 No = 2
		Tiempo (en años) de consumo de alcohol	Desconcertante	Cuantitativa	Razón	Años	Todas las existentes	
Parámetros de cometa	Parámetros / 50 células Promedios	Longitud de la cola (TL)	Dependiente	Cuantitativa continua	Razón		Todas las existentes	TL / Persona
		Momento de cola (TM)	Dependiente	Cuantitativa continua	Razón		Todas las existentes	TM / Persona
		% DNA en la cola	Dependiente	Cuantitativa continua	Razón		Todas las existentes	% DNA en cola/ Persona

7.7. DISEÑO MUESTRAL

Se seleccionaron 30 personas expuestas a pinturas y solventes orgánicos que fueron emparejados con 30 sujetos como grupo referente. Tal apareamiento pretende demostrar un efecto relativo atribuible solamente a la exposición ocupacional y reducir sesgos en los datos y por ende en el análisis estadístico. El tamaño de muestra de este estudio es el más documentado en la bibliografía revisada (Faust *et al*, 2004b) y permitió identificar como significativa una diferencia de 4.52 y 7.32 para los parámetros de cuantificación de daño genético Momento de Cola y Longitud de la Cola respectivamente, con un nivel de significancia del 5% y una potencia de la prueba del 80% (Walpole and Myer, 1997).

Tabla 4. Tamaño de muestra y condiciones de trabajo

Grupo	Tamaño de la muestra	# cultivos por persona	# de placas por persona	# de células registradas /persona*
Expuesto	30	1	2	50
Control	30	1	2	50

* El número de células registradas obedece a la comparación del material bibliográfico disponible. En general, la mayoría de publicaciones documenta un registro de parámetros de cuantificación de daño de cometa en 50 células por persona.

La unidad de muestreo fue cada una de las personas y el dato se expresó de la siguiente forma: longitud promedio de la cola, momento de cola y porcentaje de DNA en la cola, con su respectivas medidas de variabilidad (error estándar) resultado de analizar 50 células por persona

7.8. ENSAYO DEL COMETA

7.8.1. Obtención de las muestras de sangre. Fueron tomadas en el lugar de trabajo, de forma aséptica y en horas de la tarde por personal capacitado. Luego de firmado el consentimiento informado, se extrajeron 5mL de sangre periférica por venipunción en vacutainers heparinizados y debidamente rotulados con el código establecido para cada individuo. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, donde se realizó el aislamiento de linfocitos y el ensayo cometa para la identificación de daños en el DNA.

7.8.2. Aislamiento de linfocitos. De la muestra de sangre tomada (5mL) se extrajeron los linfocitos utilizando gradiente de densidad Ficoll-histopaque y centrifugación a 2300 rpm durante 30 minutos. La capa intermedia de linfocitos (producto de la centrifugación) fue

retirada, lavada con PBS y re-centrifugada a 1250 rpm por 15 minutos. Este paso se repitió 3 veces. El pellet de linfocitos fue homogenizado y aproximado a un volumen conocido de 1mL mediante la adición de PBS para conformar la solución de trabajo.

7.8.3. Prueba de citotoxicidad por exclusión con azul de Trypan. La correcta aplicación del ensayo cometa implica determinar que el daño a evaluar es producto de genotoxicidad y no de citotoxicidad (Fenech *et al*, 1999). Para tal propósito, se mezclaron 10 μ L de la suspensión de trabajo con 90 μ L de solución de azul de Tripan al 0.4%. 40 μ L de esta nueva solución fueron llevados a la cámara de conteo celular de Newbauer para determinar la relación entre linfocitos vivos y muertos (coloración azulada) que permitió conocer el porcentaje de viabilidad celular que fué aceptable entre el 85-95% (Pitarque *et al*, 1999a). Además, conociendo el número de células vivas, se determinó la cantidad de microlitros de suspensión usada en el ensayo cometa. Dicha cantidad fue ajustada a 4x10³ linfocitos en un volumen final de 75 μ L. Todos los valores de viabilidad fueron registrados en una tabla maestra (ver Anexo D).

7.8.4. Preparación de placas, lisis, desenrollamiento del DNA y electroforesis de linfocitos humanos (ensayo del cometa). Las placas base fueron preparadas con anticipación mediante la adición de 90 μ L de agarosa NMA (1%, en PBS libre de Ca⁺ y Mg²⁺) sobre portaobjetos esmerilados. La posterior ubicación de un cubreobjetos sobre el gel y la solidificación del mismo en la nevera por 10 minutos permitió formar la capa base donde se ubicó la suspensión celular de trabajo. La cantidad determinada de microlitros que contuviera 4x10³ células (exclusión con azul de Trypan) se mezcló con agarosa LMA (0.5%, en PBS libre de Ca⁺ y Mg²⁺) para completar una solución de 75 μ L que fue pipeteada sobre la capa base. Las placas fueron llevadas nuevamente a la nevera durante 15 minutos para permitir la solidificación del gel. A continuación, fueron inmersas en solución de lisis (NaCl 2.5M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% de Sarcosinato de sodio, 1% de Triton – X 100 y 10% DMSO a pH=10) por toda una noche y finalizado este proceso se lavaron con PBS para remover las sales y detergentes de esta solución. Al ser escurridas las preparaciones, se ubicaron en la cámara de electroforesis (enfriada previamente a 4°C en la nevera) con búfer alcalino (10N NaOH, 200mM EDTA, pH=13) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se corrió la electroforesis durante 30 minutos a 300mA (miliamperios) y 25 Voltios. Concluido el proceso anterior, las placas fueron lavadas durante 15 minutos con Buffer neutralizante (0.4M de Tris, pH=7.5) y fijadas con etanol absoluto (5 gotas) para su posterior registro. El proceso de tinción se realizó mediante la adición de 85 μ L de Bromuro de Etidio (1 μ g/mL) sobre los geles, previamente re-hidratados con agua destilada. La observación de las células fue realizada con microscopio de fluorescencia (Microscopio Nikon, Lámpara de Mercurio) a una magnificación de 400x y en oscuridad para prevenir la degradación del colorante.

7.9. REGISTRO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

El registro de datos se realizó mediante la toma de fotografías de los cometas (cámara SONY, 6.0 megapíxeles), siguiendo las recomendaciones de (Yendle, *et al* 1997 y Singh, 1996). En primera instancia se registraron aquellos cometas de morfología aceptable, (cabeza bien definida, separado de otros cometas) en los que pudo localizarse fácilmente el “último” punto de fluorescencia del DNA; para esto es determinante seleccionar cometas con *background* mínimo o reducido. Se evitó el registro de cometas cercanos a los extremos de la placa portaobjetos o a burbujas de aire que afectaran la migración del DNA. Se descartaron las células con DNA difuso, conocidas también como células fantasmas.

Las imágenes registradas con cámara fotográfica digital fueron transformadas del formato JPG al formato TIFF a fin de que fueran reconocidas por el programa editor de imágenes CASP, específico para el análisis de los parámetros de cometa a partir de la medida computacional de la fluorescencia y longitud de la migración del DNA. Conforme fueron analizadas las imágenes, el programa reunió todos los valores de los parámetros de cuantificación (momento de cola, longitud de la cola, % de DNA en la cola, entre otros) en una tabla maestra que fue importada a Excel para el análisis estadístico.

7.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de cuantificación de daño genético de cometa (longitud de la cola y momento de cola) fueron determinados en 50 células por persona y expresados en términos de valor promedio o mediana por conveniencia metodológica y estadística (Gichner and Plewa; 1998); y se asumió como unidad de exposición cada una de los individuos y no las células individuales (Albertini *et al.*, 2000). La mediana es una medida de tendencia central con características que la hacen muy apropiada para el tratamiento estadístico de datos; es muy sensible y robusta frente a la presencia de anomalías pues su implementación deja el 50% de los datos observados por encima del dato “medio” y el otro 50% por debajo (Gutierrez y Cintas, 2004). Los datos promediados fueron transferidos a hojas de Microsoft Excel para realizar su análisis estadístico mediante los programas SigmaPlot 2.0 (Win 95) y SigmaStat 2.0 (SPSS, Chicago, IL). Se llevaron a cabo pruebas estadísticas (con un nivel de significancia máximo de 0.05) para confirmar la distribución normal (Shapiro-Wilk), la independencia de datos (Rachas) y la homogeneidad de varianzas (Levene) con el propósito de escoger a conveniencia la aplicación de pruebas paramétricas o no paramétricas en el análisis comparativo y de correlación de los datos con variables independientes. Dado que los valores promedio de longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola no cumplieron con las asunciones de normalidad (Shapiro-Wilk: $p < 0.05$) se aplicó prueba no paramétrica U de Mann Whitney e índice de correlación Rho de Spearman.

8. RESULTADOS

8.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Los grupos de trabajo expuesto a solventes orgánicos y referente (no expuesto a solventes orgánicos) fueron conformados -cada uno- por 30 hombres sanos, seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el diseño metodológico. Los individuos del grupo expuesto fueron emparejados por sexo y edad con los individuos del grupo control con el fin de reducir sesgos en los datos y en el análisis estadístico. La tabla 4 muestra una diferencia no significativa ($p > 0.05$) entre la edad promedio de los grupos expuesto y referente (valor de $t = 0.220$). Se asume entonces que la edad deja de ser una variable o covariable más del estudio que pueda influir en las variables dependientes o parámetros de cometa.

Tabla 5: Principales características demográficas de la población de estudio.

Características demográficas	GRUPO		Diferencia entre grupos ^b
	Referente	Referente	
Numero de individuos	30	30	
Edad ^a	39.90±1.964	39.30±1.895	1.895 (>0.05)
Años de exposición ^a	-	17.83±2.059	0.000 (<0.001)
Fumadores / no fumadores	0/30	0/30	

^a Media ± Error típico. ^b Prueba t para igualdad de medias

Otras características demográficas como el hábito de fumar, el consumo de alcohol y el tiempo de exposición a solventes y pinturas fueron considerados al momento de establecer los grupos de estudio. Los 60 participantes fueron todos no fumadores o ex fumadores por un periodo mayor a 5 años. El consumo de alcohol fue registrado en términos de frecuencia semanal o mensual de consumo (ver anexo 3), y en general los participantes reportaron una ingesta de alcohol mínima (consumo social), por lo que este factor no se incluyó como factor de confusión. El tiempo de exposición a solventes y pinturas fue significativamente diferente en los dos grupos ya que para el grupo control este valor es de cero.

8.2. PARÁMETROS DE CUANTIFICACIÓN DE DAÑO DE COMETA

En esta investigación se analizaron tres parámetros: longitud de la cola del cometa, momento de cola y porcentaje de DNA en la cola, que fueron expresados en mediana por conveniencia metodológica y estadística (Gichner and Plewa; 1998). La tabla 5 resume los promedios o medianas y el error estándar de los parámetros de cometa tanto para el grupo expuesto como para el grupo referente.

Tabla 6: Valores promedio de Longitud de la cola, Momento de cola y Porcentaje de DNA en la cola para los grupos expuesto y referente.

Parámetro de cometa	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error tip. de la media
Longitud de cola (μm)	Expuesto	30	24.1333	14.8880	2.7181
	Referente	30	16.2166	12.2006	2.2275
Momento de cola (μm)	Expuesto	30	1.7093	2.7110	0.4949
	Referente	30	1.0474	3.3237	0.6068
% de DNA en la cola	Expuesto	30	4.7107	3.9210	0.7158
	Referente	30	3.0982	4.7325	0.8640

8.3. DAÑO EN EL DNA DE LINFOCITOS POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS.

El análisis estadístico de los datos con prueba no paramétrica de “U de Mann-Whitney” indica un incremento significativo de los valores promedio de la longitud de la cola, momento de cola y porcentaje de DNA en la cola (tabla 6) en los individuos del grupo expuesto a solventes orgánicos y pinturas con relación al grupo referente.

Tabla 7: Análisis estadístico de parámetros de cuantificación de cometa con prueba “U de Mann Whitney” para 2 muestras independientes

	Longitud de cola	Momento de cola	% DNA cola
U de Mann-Whitney	273.500	275.000	263.000
W de Wilcoxon	738.500	740.000	728.000
Z	-2.611	-2.587	-2.765
Sig. Asintót (bilateral)	<u>0.009</u>	<u>0.010</u>	<u>0.006</u>

Tales diferencias significativas pueden apreciarse en las figuras 3,4 y 5 en las que se observa un incremento en los valores de las medias de los parámetros de cometa para la población expuesta en relación con el grupo referente.

Figura 3: Valores promedio de la longitud de la cola entre los individuos del grupo referente y los individuos expuestos a solventes orgánicos

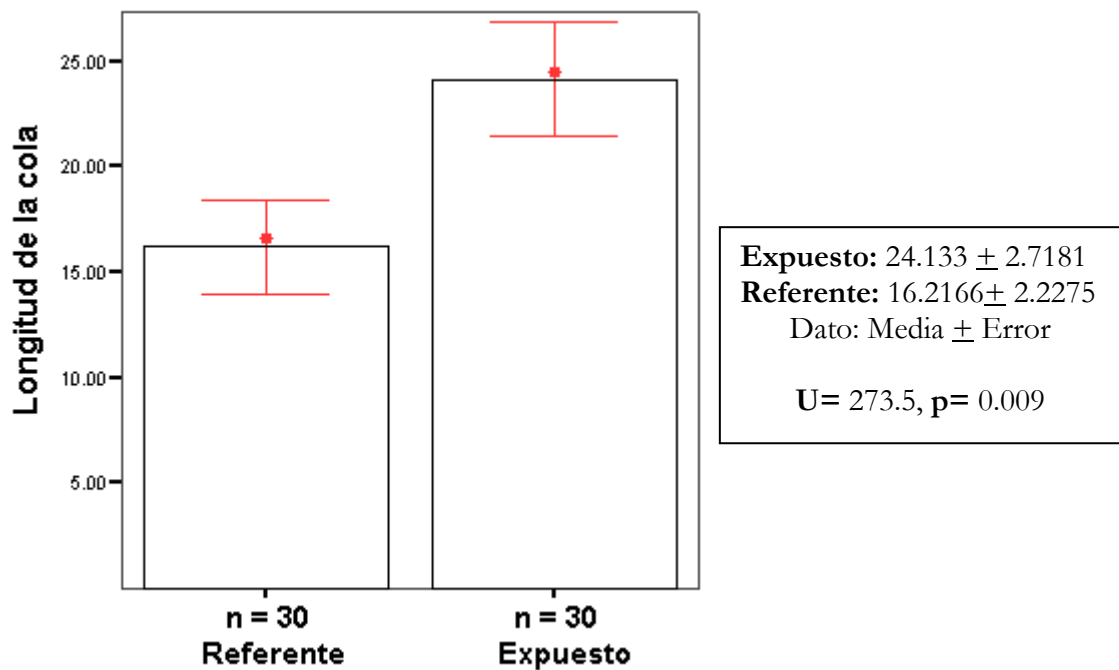


Figura 4: Valores promedio del Momento de cola entre los individuos del grupo referente y expuesto a solventes orgánicos.

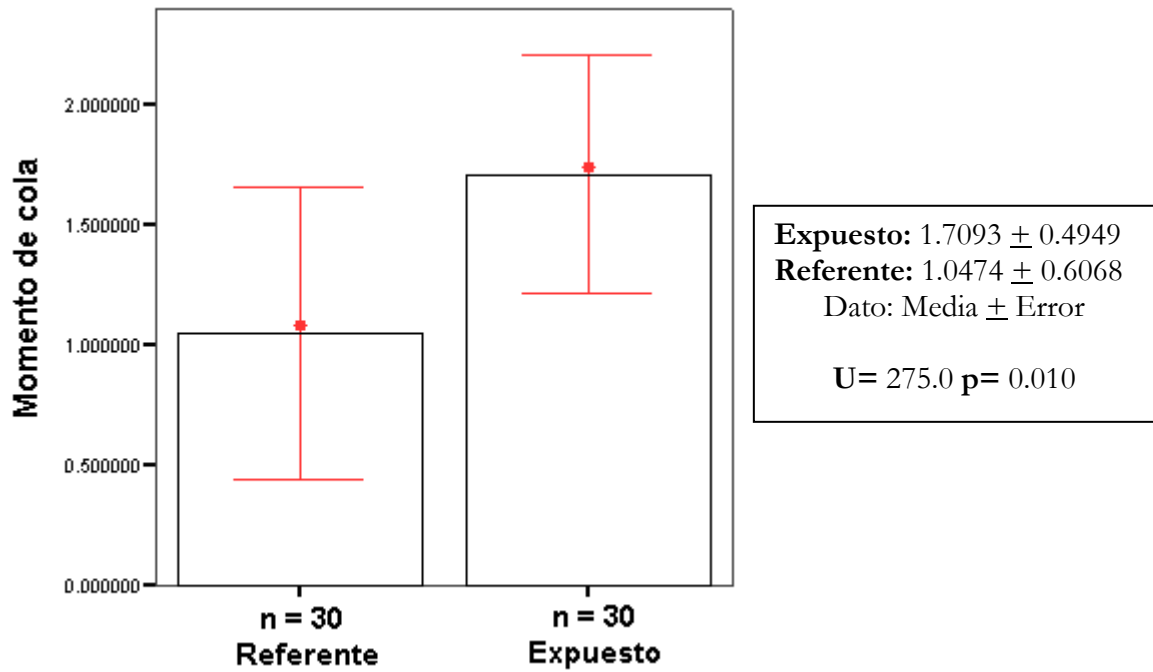
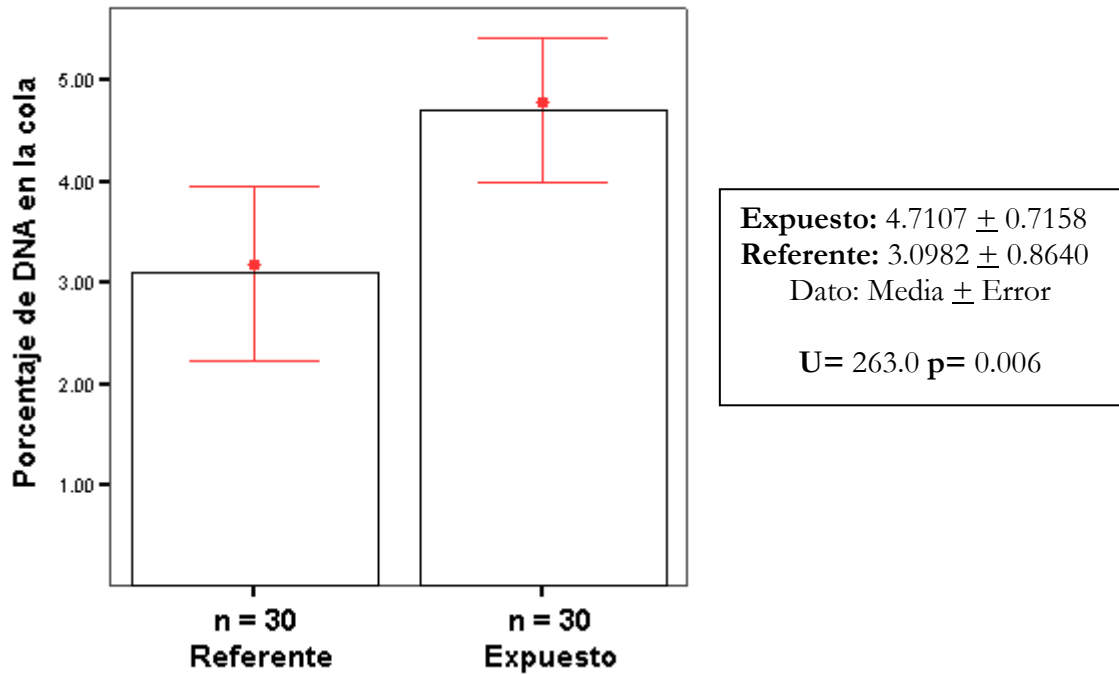


Figura 5: Valores promedio del Porcentaje de DNA de cola entre los individuos del grupo referente y los individuos expuestos a solventes orgánicos



8.4. ANÁLISIS DE CORRELACION ENTRE LOS PARÁMETROS DE CUANTIFICACIÓN DE DAÑO GENÉTICO DE COMETA, TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS) A SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS Y EDAD DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

8.4.1. Correlación entre los parámetros de cometa. La tabla 7 muestra que los parámetros de cuantificación de daño de cometa: longitud de la cola, momento de cola y porcentaje de DNA en la cola se correlacionan de forma significativa entre sí ($P < 0.000$, y coeficientes Rho de Spearman >0.95). Esto demuestra una asociación lineal positiva que indica un incremento o decremento simultaneo de los parámetros de cometa o dicho de otra forma, una relación directamente proporcional entre las mismas.

Tabla 8. Asociación lineal entre los parámetros de cuantificación de daño de cometa.

Parámetros de cometa		Longitud cola	Momento cola	% DNA cola
Longitud de la cola	Correlación Spearman	1.000	0.979**	0.962**
	Sig. Bilateral	-	0.000	0.000
	N	60	60	60
Momento de cola	Correlación Spearman	0.979**	1.000	0.990**
	Sig. Bilateral	0.000	-	0.000
	N	60	60	60
% de DNA en la cola	Correlación Spearman	0.962**	0.990**	1.000
	Sig. Bilateral	0.000	0.000	-
	N	60	60	60

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)

8.4.2. Correlación entre los parámetros de cometa, edad y tiempo de exposición. En las tablas 8 y 9 puede observarse que la edad de los 60 participantes del estudio (30 expuestos a solventes orgánicos y 30 personas del grupo referente) no fué correlacionada positivamente con los parámetros de cuantificación de daño de la prueba de cometa (coeficientes Rho de correlación de Spearman: < 0.4 y $P > 0.05$).

Así mismo, el tiempo de exposición (años) ocupacional a solventes orgánicos y pinturas de los trabajadores y los valores promedio de la longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola no mostraron asociación lineal positiva en el análisis de regresión lineal (coeficientes Rho de correlación de Spearman negativos: < 0 y $P > 0.05$).

Tabla 9. Asociación lineal entre los parámetros de cuantificación de daño de cometa y la edad (años) de los individuos.

Parámetros de cometa		Longitud de cola	Momento de cola	% DNA de cola
EDAD	Correlación Spearman	0.007	0.002	0.003
	Sig. Bilateral	0.955	0.990	0.984
	N	60	60	60

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)

Tabla 10. Asociación lineal entre los parámetros de cuantificación de daño de cometa y el tiempo de exposición (años) de los pintores de carros de Popayán.

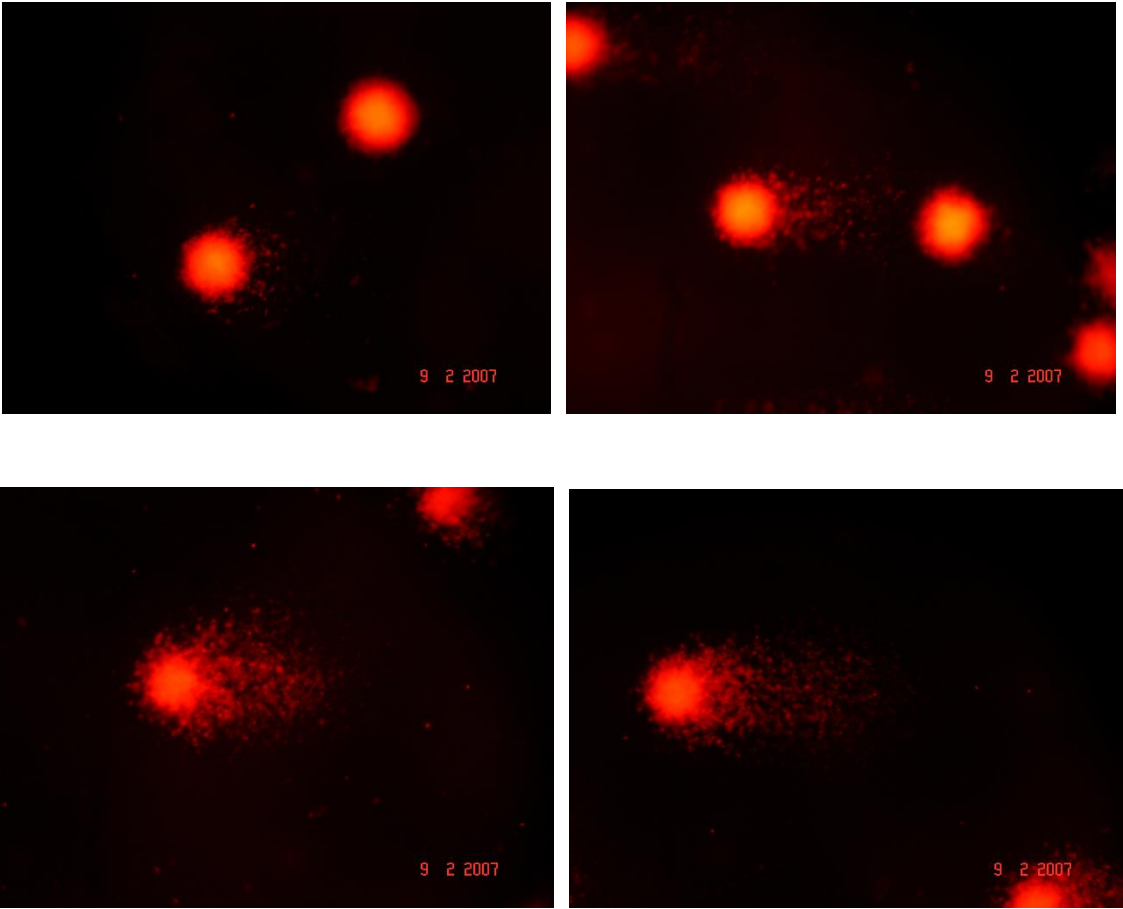
Parámetros de cometa		Longitud de cola	Momento de cola	% de DNA cola
Tiempo de exposición	Correlación Spearman	-0.032	-0.063	-0.067
	Sig. Bilateral	0.865	0.740	0.724
	N	30	30	30

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)

8.5. FOTOGRAFÍAS DE COMETAS

La toma de fotografías de cometas se realizó en microscopio de fluorescencia (magnificación 400X) mediante la tinción fluorescente del DNA de los linfocitos. Se registraron solamente los cometas con cabeza bien definida, tinción uniforme; y se descartaron las células con el DNA muy difuso (Yendle *et al*, 1997). El conteo fue realizado en la parte central de las preparaciones evitándose el registro de cometas superpuestos o con migración alterada (Singh, 1996)

Figura 6. Cometas de linfocitos humanos que exhiben diferentes niveles de daño o migración del DNA. 400X



9. DISCUSIÓN

La versión alcalina del ensayo cometa fue aplicada en este estudio para determinar daños en el DNA de linfocitos de una población de pintores de carros expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas. Este ensayo es considerado como una herramienta novedosa e importante en los estudios de biomonitorio de poblaciones humanas (Faust *et al*, 2004b), pues permite detectar rupturas de cadena sencilla o doble del DNA, ligamientos cruzados del DNA, daño oxidativo de bases nitrogenadas (Avishai *et al*, 2001), sitios lábiles al álcali (aductos de DNA) y sitios AP (apurínicos o apirimídínicos, también lábiles al álcali) producto de la reparación incompleta del DNA por escisión de bases. (Collins, 2004; Møller *et al*, 2000). Se sabe que las lesiones del DNA detectadas por medio del ensayo cometa pueden tener relevancia como eventos iniciales en la formación de alteraciones cromosómicas y que las modificaciones del DNA, consecuencia de la creación de sitios AP, también pueden ser conducentes a la inducción de mutaciones genéticas puntuales (Brendler *et al*, 2005). Sin embargo, es importante reconocer que, generalmente, estas lesiones primarias pueden ser correctamente reparadas sin resultar en una alteración genética permanente; por lo tanto los resultados producto de este ensayo deben considerarse como biomarcadores de exposición y no de efecto. En este estudio, el nivel de daño genético fue expresado en términos de Longitud, Momento y Porcentaje de DNA en la cola; en razón de que son los parámetros de cuantificación más utilizados y aceptados científicamente y permiten comparaciones con otras medidas de daño (medida micrométrica de la cola, categorización de daños) de cometa implementadas en otros estudios de biomonitorio. (Møller *et al.*, 2000).

El análisis de exposición genotóxica en la población objeto de estudio fue realizado en linfocitos de sangre periférica, que son las células más frecuentemente usadas en los estudios tradicionales de biomonitorio, pues han demostrado ser un buen tejido “sustituto” de los órganos blanco involucrados en el desarrollo de cáncer ocupacional (Bonassi, 2001a). Los linfocitos se conocen como las células centinelas del cuerpo, siendo el daño en los mismos una alerta temprana para efectos adversos de salud; en adición, las células blancas de sangre periférica son de fácil obtención y manejo (Faust *et al*, 2004b). Deben preferirse los linfocitos cuando las condiciones de exposición son constantes o cuando la toma de muestras de sangre se realiza en un día de trabajo en el que ocurrirá exposición; además, la evaluación de células blancas totales en el ensayo de cometa provee información de daño reciente al evaluar granulocitos (7-24 horas) y de daño a largo plazo (semanas-décadas) en el caso de los linfocitos B y T (Albertini *et al*, 2000).

La importancia de esta prueba citogenética – molecular puede ser interpretada de diferentes maneras en razón de que la técnica se encuentra en las fases tempranas de “desarrollo y

caracterización del biomarcador” en el respectivo proceso de validación, y las opiniones en torno a la misma y su significancia biológica pueden ser muy diferentes. Albertini *et al*, 2000, sugiere que el ensayo del cometa está en capacidad de detectar varias clases de daños en el DNA; sin embargo, hasta que la prueba del cometa no permita identificar las lesiones específicas que están involucradas mecánicamente en el proceso de iniciación y/o progresión de la tumorigenicidad, los daños del DNA determinados en un estudio de biomonitoreo son indicativo de que existe una exposición peligrosa más que un riesgo de padecer enfermedades como el cáncer; incluso atribuir riesgos individuales de padecer esta enfermedad a partir de los resultados de cometa podría ser prematuro e injustificable (Collins, 2004). Ahora bien, el hecho de que en algunos estudios de biomonitoreo el incremento en los parámetros de cuantificación de daño de cometa estén relacionados con un aumento en la frecuencia de biomarcadores de efecto, tales como las alteraciones cromosómicas y micronúcleos; sería indicativo de que las rupturas de DNA detectadas en el ensayo del cometa no fueron reparadas (o reparadas incorrectamente) y fueron fijadas de forma permanente como mutaciones cromosómicas (Faust *et al*, 2004a). Sea como fuere, un incremento en los parámetros de cometa permitirá determinar daños en el DNA por exposición ocupacional a agentes genotóxicos y se constituirán en una herramienta clave para alertar a las poblaciones objeto de estudio con el fin de formular acciones correctivas y de prevención.

9.1. DE LA METODOLOGIA

El ensayo cometa como herramienta para estudios de biomonitoreo se ha fortalecido con el creciente número de publicaciones en los últimos años (Faust *et al*, 2004a). La popularidad de esta técnica está ilustrada por el número total de entradas en la base de datos PubMed cuando se usan las palabras de búsqueda “comet assay” (2300 a septiembre de 2005) (Møller, 2006). Sin embargo la falta de una metodología estandarizada resulta en la publicación de un gran número de variantes de la técnica, y en consecuencia los datos obtenidos pueden ser inconsistentes e incomparables entre sí (Faust *et al*, 2004a). Excepto por los pasos básicos de lisis, desnaturalización del DNA, electroforesis y neutralización no existe un protocolo estándar para este ensayo (Møller *et al*, 2000). Por lo anterior, la metodología aplicada en este estudio fue el resultado del análisis e integración de varias publicaciones de biomonitoreo y el ensayo cometa; con el fin de conformar un protocolo unificado y aprovechar las recomendaciones dadas por cada uno de los autores. Es de resaltar que el protocolo calibrado para la aplicación de la prueba de cometa en el monitoreo por exposición a pinturas y solventes orgánicos en pintores de la ciudad de Popayán fue válido, confiable y repetible en las condiciones de laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. En consecuencia, es importante resaltar la importancia metodológica de algunos procedimientos de diseño y experimentales propuestos en este estudio; en razón de que variables técnicas o modificaciones particulares de los laboratorios en el ensayo cometa afectan la sensibilidad de la misma y son punto de discusión en el mundo (Rojas *et al*, 1999); pues, como ya fue mencionado anteriormente, la

técnica se encuentra en etapas tempranas del proceso de validación como biomarcador de riesgo de cáncer (Bonassi *et al*, 2001a).

La aplicación de la electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa en estudios de biomonitorio se encuentra en una fase en la que se están identificando numerosos factores de confusión, que podrían o no tener relevancia en la determinación del nivel basal de daño en el DNA (dieta, actividad física, medicación...); desde luego, el efecto de esas variables debe ser evitado al máximo. Varios autores sugieren el diseño de estudios “pareados” o de emparejamiento de los individuos de poblaciones expuestas con igual número de individuos referentes, con el fin de excluir el mayor número de variables desconcertantes de un biomonitorio (Møller *et al*, 2000). Este tipo de estudio también es conocido como *cross sectional* y fué el implementado en este proyecto de investigación.

Factores determinantes en estudios *ex vivo* como el género y el hábito de fumar de los participantes fueron considerados, previo establecimiento de la etapa experimental de este estudio, en razón de que los mencionados factores pueden tener efectos moduladores - aditivos o sinérgicos- en los niveles de daño del DNA evaluados mediante el ensayo cometa (Faust *et al*, 2004a). De estos factores, quizá el que ha recibido mayor atención es el hábito de fumar, probablemente por contener una gran cantidad de compuestos genotóxicos (Hoffman and Speit, 2005), de los que se conocen alrededor de 40 carcinógenos y mutágenos (Betti *et al*, 1995; IARC, 1986a; Piperakis *et al*, 1998; Sinko *et al*, 2005); además, varios investigadores han encontrado asociación entre el hábito de fumar y el incremento de los parámetros de cuantificación de daño genético de cometa (Carere *et al*, 2002; Grover *et al*, 2003; Lam *et al*, 2002; Palus *et al*, 2003; Pitarque *et al*, 1999b; Rojas *et al*, 1996; Zhu *et al*, 1999, 2001). En cuanto al género de los participantes, estudios de biomonitorio con cometa han reportado una posible modulación o incremento de los daños en el DNA por el sexo masculino (Lam *et al*, 2002; Bajpayee *et al*, 2002). Por tales razones, el estudio fue realizado únicamente en hombres saludables, excluyendo a los fumadores o ex fumadores.

Especial importancia se le ha dado a la hora de la toma de las muestras de sangre en estudios con cometa, pues se sabe que lesiones primarias del DNA, como rupturas de cadena sencilla, pueden repararse en tiempos muy cortos y perderse en el transcurso experimental de la técnica, de tal forma que no serían evaluados como un incremento en la migración del DNA (Collins *et al*, 1997). Además, las células que están muy dañadas podrían desaparecer de la muestra a través de procesos necróticos o apoptóticos (Albertini *et al*, 2000). El tiempo óptimo de muestreo para cualquier población celular es durante la exposición (crónica), donde presumiblemente la inducción y reparación de daños del DNA se encuentra en un estado continuo; este tiempo de muestreo maximiza la probabilidad de identificar una exposición a un agente dañino para el DNA (Albertini *et al*, 2000). En este estudio *ex vivo*, la toma de muestras de sangre de la población expuesta fue realizada siempre a la misma hora y al final de la jornada de trabajo (horas de la tarde).

De los tipos de lesiones reveladas por la prueba del cometa, se ha dado una gran discusión alrededor de la generación de sitios AP, que no son más que sitios lábiles al álcali producto de la depurinación de una base dañada o de un nucleótido que durante el tratamiento alcalino originarán rupturas de cadena sencilla. Si se tiene en cuenta que la generación de sitios AP constituye un paso intermediario en los procesos de reparación del DNA, podría pensarse que estos sitios son los principales contribuyentes a la cantidad total de DNA detectado en la cola de los cometas. En consecuencia, un alto nivel de rupturas expresado en el incremento en los parámetros de cometa sería indicativo tanto de lesiones en el DNA producto de la exposición a un agente mutagénico como de una elevada y eficiente reparación de daños. La mejor medida para asegurar que el daño genético evaluado es, mayormente, producto de lesiones primarias causadas por la exposición y no de una elevada tasa de reparación es no inducir la proliferación de los linfocitos con fitohemaglutinina u otro mitógeno. El linfocito al ser una célula no proliferativa está pobremente suplementado con precursores de DNA, de ahí que su tasa de reparación de daños sea más bien lenta. Un estudio realizado por Collins *et al*, 1997 demostró que si precursores de DNA (desoxiribonucleósidos) son suplementados exógenamente en linfocitos irradiados con luz UV (inductor de foto lesiones apreciables como rupturas), la tasa de reparación es tan elevada que no se aprecia migración en las colas de los cometas. Por las anteriores razones, en este biomonitoreo se trabajó con linfocitos no estimulados, siguiendo las recomendaciones de Albertini *et al*, 2000.

En los últimos años la prueba alcalina de cometa ha tenido varias modificaciones (desde su versión neutra) que han afectado considerablemente la sensibilidad de la misma; entre las más importantes se encuentran: la composición y pH de la soluciones de lisis y electroforesis y las condiciones electroforéticas en términos de voltaje, amperaje, tiempo de desenrollamiento y corrimiento. Rojas *et al*, 1999, propuso una metodología estándar para el ensayo de cometa alcalino (pH>13), basado en 300 publicaciones con el ensayo cometa. Tal metodología unificada está de acuerdo con la implementada para este estudio y podría pensarse que los datos obtenidos pueden ser comparables en gran medida con otras publicaciones.

9.2. EFECTOS TÓXICOS Y DAÑO EN EL DNA DE LINFOCITOS POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS EN PINTORES DE CARROS

En general, las personas que trabajan, sea cual fuere su oficio, se encuentran expuestas a una gran variedad de agentes químicos propios de su ocupación. Tal exposición puede contribuir al desarrollo de enfermedades, tanto a corto como a largo plazo; estas últimas asociadas generalmente a mecanismos que involucran cambios en el DNA (Roth *et al*, 2003). En el oficio de pintor, las personas se exponen a sustancias nocivas, como solventes orgánicos, pinturas que contienen pigmentos a base de plomo y monómeros plásticos residuales (Pinto *et al*, 2000). De los solventes orgánicos es bien conocida su toxicidad o

los efectos en la salud por exposiciones agudas; se sabe que el contacto dérmico y la inhalación de vapores de estos puede ser causal de: dolor de cabeza, falta de coordinación muscular, disnea, confusión general, dolores en el pecho, malestares estomacales, afectación de funciones del hígado, conjuntivitis, vértigo, dermatitis, dificultades respiratorias, insomnio ceguera bilateral, necrosis hepática (Iavicoli *et al*, 2005) e incluso la muerte (Ilgazli *et al*, 2004) De mayor importancia es el hecho de que la exposición a solventes orgánicos se considera como un problema de salud pública, pues evidencia epidemiológica ha permitido relacionar la exposición a solventes con riesgo de padecer cáncer, como principal efecto a largo plazo (Lynge *et al*, 1997). Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer IARC (IARC, 1989), existe “evidencia suficiente” en humanos y en animales de carcinogenicidad por la exposición ocupacional en pintores. Varios estudios atribuyen mayores riesgos de padecer cáncer de pulmón, hígado, vejiga, colon, páncreas, boca, faringe, próstata, testículo, linfomas, mielomas, leucemias y tumores cerebrales como resultado de la exposición a solventes o mezclas de solventes orgánicos en el oficio de pintor (Lynge *et al*, 1997). Es evidente la necesidad de dirigir investigaciones hacia la evaluación de daños genéticos por la exposición ocupacional de esta población con el propósito de motivar la implementación de medidas preventivas que incluyan actividades educativas y de control con respecto al uso y manejo de solventes orgánicos y pinturas.

Los pintores de carros de la ciudad de Popayán se encuentran expuestos a solventes orgánicos como el Xilol y el Metanol y a mezclas complejas de solventes orgánicos como la gasolina y el *thinner*; este último se compone de más de 50 sustancias químicas diferentes; entre las que se encuentran el Tolueno, las tres formas isoméricas (orto, meta y para) del Xileno, Hexano y Etil benceno; entre otros (Hoyos, 2003). Las pinturas de automóvil también pueden considerarse como mezclas complejas conformadas por varios solventes orgánicos; mezclas de solventes -como el *thinner*- y pigmentos a base de plomo (Gajalakshmi *et al*, 2002); la concentración de este elemento es variable y determinante en el color y se encuentra mayormente en las pinturas de color amarillo (Pinto *et al*, 2000). En cuanto a la gasolina, se sabe, está compuesta por varios hidrocarburos aromáticos, entre ellos el benceno (Farmer *et al*, 2003). Otro tipo de sustancias asociadas al oficio de pintura de automóviles son los monómeros plásticos residuales entre los que se encuentran Etil acrilatos, Metil acrilatos y Vinil acrilatos (IARC, 1986b) y resinas como Uretanos, Poliestres e Isocianatos (Silva y Mello, 1996). Este tipo de sustancias y sus efectos genotóxicos no están documentados ampliamente, pues los estudios de exposición ocupacional en pintores se enfocan solamente en los efectos de las sustancias químicas contenidas en pinturas y *thinners* y no en los residuos químicos consecuencia de la preparación de las superficies a pintar. Dada la gran volatilidad de los solventes mencionados anteriormente, la ruta primaria de absorción es la inhalación, aunque solventes como el Tolueno y el Xileno pueden penetrar la piel y pasar al torrente sanguíneo (Löf and Johanson, 1998). Entre los factores que pueden influenciar la toxicocinética de los solventes orgánicos se encuentran la concentración de las sustancias, el tiempo de exposición, la actividad física y el depósito graso del cuerpo (Löf and Johanson, 1998; Zimmer *et al*, 2006). En la población objeto de estudio otros factores también son

determinantes en la exposición, tales como la ausencia de medidas de protección, lugares de trabajo con poca ventilación y jornadas de actividad que pueden superar las 8 horas diarias. La combinación de todos estos factores hace que la población estudiada esté en mayor riesgo de presentar daños genéticos.

El Benceno, solvente de gran utilidad industrial, ha sido clasificado por la IARC como carcinógeno del grupo 1, con suficiente evidencia de carcinogenicidad en humanos y animales de laboratorio (IARC, 1988); la ACGIH (Conferencia Americana de Higiene Industrial Gubernamental) también reconoce su carcinogenicidad desde 1982 (Roma-Torres *et al*, 2006). Es un químico radiomimético capaz de producir muchos tipos de daños genéticos que incluyen las alteraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas y micronúcleos; de ahí que su asociación con enfermedades degenerativas de la médula ósea, disfunciones del sistema inmune (Anderson *et al*, 1995) y generación de leucemias esté muy bien documentada (Lynge *et al*, 1996). El benceno también es considerado clastogénico (Pitarque *et al.*, 1999a); sin embargo, no ha sido asociado con la generación de mutaciones puntuales en sistemas de genotoxicidad (Dean, 1985).

La exposición a solventes orgánicos como el benceno puede presentarse en varias ocupaciones: zapateros, técnicos de laboratorio, pintores, empleados de estaciones de servicio, trabajadores de imprenta entre otros; y muchas publicaciones asocian el benceno como un posible responsable del incremento de anormalidades cromosómicas ACs (Picciano, 1979; Tunca and Egeli, 1996;), intercambio entre cromátidas hermanas ICHs (Xu *et al*, 1998; Popp *et al*, 1992) y micronúcleos MN (Surralles *et al*, 1997) en estas poblaciones. Sin embargo, pocos artículos existen sobre la exposición ocupacional particular de los pintores de carros a los solventes orgánicos contenidos en pinturas y thiners. Existe evidencia que asocia significativamente ($p < 0.05$) el incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas (Silva y Santos-Mello, 1996; Nagalakshmi and Ong, 1999), intercambios de cromátidas hermanas y micronúcleos (Pinto *et al*, 2000) con la exposición ocupacional de esta población al benceno contenido en los materiales de trabajo

El Tolueno y el Xileno son solventes ampliamente usados en pinturas y thiners y según la IARC (1987) se clasifican como no genotóxicos o carcinógenos para humanos. Del Tolueno, particularmente, se ha aceptado su neurotoxicidad (Greenberg, 1997); sin embargo su genotoxicidad permanece en discusión, pues algunos reportes revelan incremento de riesgo de cáncer por exposición a tolueno y carcinogenicidad a largo plazo en ratas (Murata *et al*, 1999). Esta evidencia inadecuada de genotoxicidad responde a que la exposición al Tolueno se presenta cuando este hace parte de mezclas complejas de sustancias, por lo que se acepta que sus efectos son consecuencia de interacciones sinérgicas (Braubtar and Williams, 2002; Feron *et al*, 1998). Se ha reportado que este químico puede incrementar la susceptibilidad del huésped a otros carcinógenos y/o afectar la biotransformación de productos genotóxicos del metabolismo de otros solventes (Heuser *et al*, 2007). Más interesante aún es el hecho de que el Tolueno interactúa de tal forma con

el benceno que puede llegar a reducir su toxicidad y generar un efecto protector cuando se han ingerido grandes cantidades de estas sustancias (Plappert *et al*, 1994). El Xileno también se ha reportado como un químico sinérgico en mezclas complejas, pues interfiere en el metabolismo del Tolueno y es responsable del incremento de enzimas de bioactivación en el hígado (Braubtar and Williams, 2002). Es por ello que la ASTDR (ASTDR, 1995) considera que el Tolueno y el Hexano no son genotóxicos o carcinógenos, siempre y cuando la exposición a estas sustancias ocurra de forma particular (compuestos aislados). Incrementos significativos en la frecuencia de alteraciones cromosómicas (ACs), intercambios entre cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos (MNs) se han reportado en zapateros y trabajadores del petróleo expuestos a solventes orgánicos en los que se encuentran el Tolueno y el Xileno como parte de mezclas complejas (Bauchinger *et al*, 1982; Torres-Roma *et al*, 2006; Peclova *et al*, 2000)

El Plomo es un metal pesado de gran utilidad en la fabricación de baterías y soldaduras, y se encuentra en pinturas como parte de los pigmentos ((Pinto *et al*, 2000). La IARC ha clasificado este metal en el grupo 2B como posible carcinógeno con base en evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales experimentales, pero con evidencia inadecuada de carcinogenicidad en humanos (IARC 1987). La exposición a este metal en sistemas *in vitro* y *ex vivo* tiene efectos en el incremento de la frecuencia de AC e ICH (Danadevi *et al*, 2003); sin embargo, los resultados son contradictorios y permanecen bajo discusión (Johnson, 1998). En pintores la exposición a plomo también ha sido asociada significativamente con incrementos de ICHs y ACs (Pinto *et al*, 2000).

La exposición ocupacional a solventes orgánicos en diferentes grupos de trabajo ha sido evaluada a través del ensayo alcalino del cometa. El oficio de la zapatería es el más documentado y está asociado con exposición rutinaria a Hexano, Tolueno y Benceno (como contaminante de adhesivos). Diferencia significativa ($p < 0.05$) fue encontrada en los estudios de Heuser (2005, 2007), donde el incremento en el índice y la frecuencia de células con daño genético fueron los parámetros de cometa asociados a la exposición ocupacional. Los daños en el DNA fueron atribuidos a las posibles interacciones sinérgicas de solventes como Acetona, Hexano y Tolueno, que por sí solos no son considerados genotóxicos o carcinógenos. Un tercer estudio realizado por Pitarque *et al* (1999a) no reporta diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores del momento y porcentaje de DNA en la cola de un grupo de zapateros expuestos a Tolueno, Benceno y otros solventes orgánicos en relación al grupo control. Este resultado fue sustentado con base en la posible eliminación de células con alto daño genético durante el proceso de criopreservación de los linfocitos; también se sugiere que el alto nivel de daño genético de los dos grupos, consecuencia de la exposición ambiental general, pudo enmascarar diferencias asociadas a la exposición ocupacional de los zapateros. La exposición de trabajadores de refinerías de petróleo a Benceno, Tolueno y Xileno (BTX) fue evaluada por Torres-Roma (2006), mediante la prueba de cometa, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) en la longitud promedio de la cola del grupo expuesto en relación al grupo

referente. Tales resultados fueron sustentados en las referencias de daño genético reportados por otros autores para el Benceno, y la mezcla de éste con Tolueno y Xileno.

Estudios del daño en el DNA por la exposición ocupacional de pintores de carros a través del ensayo cometa son pocos; sin embargo, algunos reportan diferencias importantes entre los grupos de estudio. Zhu (2001), relaciona el oficio de pintor (expuesto a mezclas BTX) con un incremento muy significativo ($p < 0.002$) de los valores del momento de cola, respecto al grupo referente. El daño genético no fue asociado a ningún químico en particular, sino a la mezcla compleja de los mismos. Incremento significativo ($p < 0.001$) de la longitud de la cola fue encontrada por Roth *et al*, (2003) en un grupo de pintores de carros expuestos a pinturas, solventes y benceno con respecto al grupo control. Sin embargo, el pequeño número de la muestra de estudio ($n=10$) podría no reflejar la realidad de la exposición, si se tiene en cuenta que la unidad de muestreo en el ensayo cometa no es la célula sino el individuo. Tal incremento observado en el grupo expuesto fue atribuido a la genotoxicidad general de los compuestos químicos de la exposición. Cok. *et al*, (2004) reportan un incremento significativo ($p < 0.0001$) de daños genéticos en inhaladores de *thinner* (como abuso de sustancia psicoactiva). Los autores sugieren que el incremento de daños en el DNA está dado por la exposición a la mezcla de sustancias BTX contenidas en el *thinner*. Los datos de este estudio pueden ser comparables a la exposición de los pintores de carros si se tiene en cuenta que en ambos casos la ruta predominante de exposición a los solventes es la inhalatoria y que el abuso de esta sustancia se da en forma aguda por un tiempo no mayor a 30 minutos, mientras que en los pintores de carros la exposición puede superar las 8 horas diarias.

En este estudio se evaluó el daño en el DNA de linfocitos a través de tres parámetros de cuantificación de cometa: Longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola. La longitud de la cola es el parámetro más comúnmente usado y es la medida de longitud total del DNA migrado; se relaciona directamente con el tamaño de los fragmentos y es proporcional a la cantidad de daño en el DNA (Rojas *et al*, 1999); sin embargo, es muy sensible al *background* y cesa su incremento a grandes niveles de daño genético, por lo que su utilidad es motivo de discusión (Collins, 2004; Laffon *et al*, 2002). El momento de cola es el producto de la longitud y la intensidad de la cola (o % DNA cola) y aunque es un valor muy usado no es la manera más apropiada para la cuantificación de daño, pues no da ninguna información acerca de la apariencia del cometa y su variabilidad es muy elevada. Se ha demostrado que la distribución de ese parámetro no obedece a la normalidad (distribución de Chi^2), mientras que los valores del producto que lo originan sí tienden a ajustarse a la misma (Bauer *et al*, 1998). Estas razones justificaron la inclusión de un nuevo parámetro en este estudio: el porcentaje de DNA en la cola, ya que ha sido reconocido por varios autores como el valor de mayor utilidad y sensibilidad pues es menos susceptible a variaciones entre experimentos (De Boeck *et al*, 2000), y permite una discriminación visual de cometas mas acertada; da una clara indicación de la morfología y apariencia del cometa (Collins, 2004) y puede ser comparable con otros sistemas de cuantificación de daño, como el de categorización de cometas en diferentes niveles de migración (Tice *et al*, 2000).

El análisis de los valores de cometa indicó un incremento significativo en la longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola para el grupo expuesto en relación al grupo referente ($P < 0.010$; Prueba U de Mann-Whitney). Esta diferencia es dependiente de la exposición ocupacional de los pintores de carros a solventes orgánicos y pinturas, y por lo tanto el incremento de daños en el DNA de linfocitos puede atribuirse a los diferentes compuestos químicos que hacen parte de estos materiales de trabajo: Benceno, Tolueno, Xileno, entre otros, sin razón a atribuir efectos genotóxicos a un solo compuesto químico, pues la exposición se está presentado a mezclas complejas de sustancias y se espera que existan interacciones sinérgicas entre ellos.

La activación e inactivación metabólica de sustancias químicas es determinante en su potencial efecto genotóxico, pues agentes reactivos pueden generarse durante estos procesos y unirse covalentemente a macromoléculas como el DNA (Heuser *et al*, 2007). Este es el caso de los solventes orgánicos, que al ser sustancias apolares deben ser sometidos a reacciones químicas, propias del metabolismo microsomal (CYP450, EPHXs), para incrementar su solubilidad y facilitar su excreción; sin embargo, estas reacciones generan productos intermedios de mayor toxicidad que el compuesto parental (bioactivación), radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Costa *et al*, 2006; Mattia *et al*, 1991) que pueden inducir lesiones primarias en el DNA detectables por el ensayo cometa.

El metabolismo del Benceno involucra tres rutas principales: Reacción con Glutación para producir Ácido Mercaptúrico, conversión a Bencenglicol y transformación de éste por apertura del anillo aromático en Acido Mucónico -para ser excretado en la orina- y la más importante: oxidación del anillo bencénico por CYP450 que origina un epóxido reactivo que puede transformarse en Fenol. La hidroxilación del Fenol por la enzima Epóxido Hidrolasa origina Catecol, Hidroquinona y Benzoquinona (Sul *et al*, 2005) que son considerados como los metabolitos más tóxicos y tienen la capacidad de unirse covalentemente al DNA (Glatt and Witz, 1990). Situación similar se presenta con el Tolueno; en los humanos éste es metabolizado hacia Acido Benzoico que al ser conjugado con glicina se excreta como Acido Hipúrico. Sin embargo, una menor proporción (1%) atraviesa por un proceso de oxidación del anillo aromático hacia las formas orto y para Cresol (Cok *et al*, 2004). La hidroxilación del Cresol es de gran importancia biológica pues genera el metabolito reactivo Metilhidroquinona, que también puede causar daños en el DNA (Murata *et al*, 1999).

Los epóxidos, en general, son radicales formados por un átomo de oxígeno unido a dos átomos de carbono (Wade, 1993), y se han asociado como responsables de daño en el DNA por alquilación de bases, generalmente, en el nitrógeno en posición 7 de la Guanina (Laffon *et al*, 2002). La alquilación del anillo de Imidazol de esta base inestabiliza la estructura del DNA, que se abre en el lugar de la lesión originando sitios AP (Laffon *et al*, 2002). En adición, la formación de enlaces covalentes entre los metabolitos del Benceno y el Xileno

con el DNA conlleva la formación de aductos, que al ser reparados por retraimiento de la base aducta dan origen a sitios intermedios de reparación o sitios AP. Estos sitios son lábiles al álcali por lo que al ser convertidos en hebras sencillas de DNA (rupturas) durante el proceso de desenrollamiento alcalino migrarán durante la electroforesis; sin embargo, algunos aductos pueden ser convertidos directamente a rupturas de DNA cuando el pH de la solución de desenrollamiento es superior a 13 (Møller *et al*, 2000). Por lo anterior, puede inferirse que el daño por alquilación y formación de aductos es responsable, en parte, del incremento significativo en los parámetros de cuantificación de daño de cometa en la población objeto de estudio con respecto al grupo referente.

Además del daño por alquilación, los solventes también pueden ejercer su toxicidad a través de una vía indirecta del metabolismo: la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que inducen daño oxidativo en el DNA (Anderson *et al*, 1995). El benceno, específicamente, es sustrato del CYP450 2E1, una enzima microsomal que genera gran cantidad de especies reactivas de oxígeno durante los procesos metabólicos; entre esas especies se encuentran el anión Superóxido y el ión Hidroxilo (Ilgazli *et al*, 2004); estos radicales al poseer uno o más electrones desapareados pueden unirse a los ácidos nucleicos y a las bases nitrogenadas de los mismos, originando mutaciones y alteración en la función génica (Hwang and Kim, 2007). Todos los componentes del DNA pueden ser atacados por el ión Hidroxilo mientras que el ión Superóxido ataca preferencialmente a la Guanina. Producto de este daño oxidativo pueden formarse cuatro bases: 8-hidroxideoxiguanosina, Timinglicol, Formilamidopirimidina y 8-Hidroxideoxiadenina (Bratsch and Nair, 2004). La Guanina en su estado oxidado 8-OHdG es un potencial mutágeno debido a que causa apareamiento incorrecto de bases nitrogenadas y posteriores errores en el marco de lectura que originan mutaciones puntuales relacionadas con la carcinogénesis (Hwang and Kim, 2007).

Las especies reactivas de oxígeno inducen rupturas directas en la hebra de DNA, por lo que la fase de desenrollamiento alcalino y electroforesis revela este tipo de daños como incrementos en la migración (Møller *et al*, 2000). El reconocimiento de bases oxidadas en el ensayo de cometa involucra la incubación del DNA con enzimas de reparación específicas que inducirán rupturas de cadena sencilla en el lugar de la lesión, por ejemplo la Endonucleasa III para la detección de pirimidinas oxidadas; sin embargo, no puede descartarse el hecho de que algunas bases oxidadas puedan ser reconocidas y abducidas por enzimas de reparación de daños del DNA originando sitios AP lábiles al álcali. El daño oxidativo a través de la generación de ROS ha sido asociado también a la exposición de vapores de Estireno, Xileno, Acetona y Percloroetileno (Costa *et al*, 2006; Sul. *et al*, 2005). Sugiero que el mayor aporte de daños al DNA por los solventes orgánicos está dado a través de esta vía, ya que los epóxidos generados en la oxidación del anillo aromático del Benceno y del Tolueno sólo se forman en una proporción inferior al 5 % (ASTDR, 2001) mientras que la actividad metabólica microsomal se hace presente a lo largo de toda la toxicocinética de los solventes orgánicos.

En condiciones *in vitro*, el metabolito del benceno, p-Benzoquinona también puede causar daños en el DNA de linfocitos por ligamiento cruzado (*crosslinking*) ((Anderson *et al*, 1995). Este tipo de lesiones reduce la migración del DNA en la tapa electroforética del ensayo cometa y no permite observar los daños genéticos causados por un químico específico, aun cuando el daño exista. Si posibles daños *crosslinking* se indujeron en el DNA de linfocitos de la población objeto de estudio podría pensarse que la exposición a este metabolito fue insignificante o inexistente, pues se detectaron diferencias estadísticas entre los parámetros de cometa (determinados por los niveles de migración) de los dos grupos (expuesto y referente). Sin embargo, no puede aceptarse completamente la idea de que este metabolito no haga parte la exposición ocupacional y cause daños en el DNA; ya que algunos autores sugieren que las severas condiciones alcalinas de la prueba del cometa pueden romper estos ligamientos y en consecuencia este tipo de daños no afectará de ninguna manera los niveles de DNA en la cola de los cometas (Zhu *et al*, 2001). Cualquiera que fuese la situación, podría presumirse que el metabolito p-Benzoquinona es preferencialmente formador de aductos y no de ligamientos cruzados, pues su afinidad química por bases nitrogenadas, como por ejemplo la guanina, le brindan enlaces de mayor facilidad y estabilidad, mientras que el ligamiento cruzado implica una unión química más compleja, por cuanto debe unirse a dos centros nucleofílicos del DNA.

Estudios *in vitro* con linfocitos han demostrado que el Plomo causa daños en el DNA a través de mecanismos indirectos de toxicidad; bien sea incrementando la genotoxicidad de compuestos alquilantes, como los que pueden encontrarse en los solventes orgánicos, o participando en la generación de radicales libres a través de la reacción de Fenton y el Peroxido de Hidrogeno (Fracasso *et al*, 2002). Lo anteriormente propuesto puede reflejar la realidad de la exposición de los pintores de carros a los solventes y al Plomo contenido en las pinturas si se tienen en cuenta, primero, varios estudios han reportado incremento de daños en el DNA (incremento de los parámetros de cometa) de personas expuestas a Plomo (Fracasso *et al*, 2002; Groot *et al*, 2000) demostrando una interacción entre el metal y el DNA; segundo, la reacción de Fenton, que origina radicales libres hidroxilo a partir del Peroxido de Hidrogeno y la presencia de metales en la cromatina (Figura 56), y tercero, el Peroxido, que es un producto del metabolismo oxidativo del Benceno (Sul *et al*, 2005). Los puntos específicos de la cromatina, donde se encuentran los metales precursores de la reacción de Fenton, se constituyen como “hot spots” o puntos nucleofílicos para el ataque de radicales libres (Villani *et al*, 2000) que producirán daños en el DNA detectables a través del ensayo cometa.

Figura 7. Producción de iones Hidroxilo a través de la reacción de Fenton



La edad es considerada como un posible factor modulador de daños en el DNA (Faust *et al*, 2004b); pues es razonable especular que las células de personas de mayor edad (en relación a un grupo más joven) exhiban mayor daño genético posiblemente acompañado por una disminución en la eficiencia de reconocimiento y reparación de daños inducidos (Zhu *et al*, 1999). Estudios han mostrado correlación positiva entre la frecuencia de alteraciones cromosómicas y la edad de los participantes; Roma-Torres *et al* 2006; reportan una asociación lineal ($p>0.05$) entre el incremento de AC con respecto a la edad en una población expuesta a solventes orgánicos (rango de edad 39 – 42 años). Similarmente, Wojda *et al* 2006; al relacionar la edad y los daños cromosómicos de una población de hombres y mujeres (rango de edad 21 - 78 años) con respecto a una de “personas centenarias” hallaron un incremento significativo ($p>0.05$) en el nivel de daño cromosómico que fué correlacionado positivamente con la edad y atribuido a la división y acumulación de células con daños adquiridos a través del tiempo. Las publicaciones en torno a la modulación de la edad sobre el daño cromosómico es contradictoria, ya que algunos estudios no las correlacionan significativamente. La frecuencia de ACs y la edad también han sido estudiadas bajo la influencia de los polimorfismos de genes de reparación hOGG1, XRCC1 XRCC3, ERCC2, en una población Caucásica de 672 donantes (Skejelbred *et al*, 2006). Los resultados no solo reportan que la frecuencia de ACs no se correlaciona con la edad, sino un efecto protector del polimorfismo XRCC3 241Met para el grupo de mayor edad. Una asociación negativa entre la frecuencia de AC y la edad también fue reportada por Surralles, *et al* 1997; así como otros autores referidos por estos autores. La influencia de la edad en los niveles de daño cromosómico es de amplia discusión, pues la información existente no es concluyente. En contraste, un estudio de revisión reportó la asociación significativa entre la edad y la frecuencia de Micronúcleos mediante el análisis de un “pool” de datos de varios laboratorios en el mundo que utilizan este biomarcador. Dicho estudio contó con la participación del HUMN (Proyecto Internacional de Micronúcleos-Humanos) y se constituye como la evidencia más reciente y documentada de la relación entre los MN y la edad (Bonassi *et al*, 2001b).

La influencia de la edad de los individuos en el ensayo cometa ha sido determinada en varios estudios de biomonitorio con resultados conflictivos (Moller *et al*, 2000). Un estudio *cross-sectional* en norteamericanos sanos (rango de edad 25-91 años) no mostró un efecto o modulación significativo ($p>0.05$) por la edad en el nivel basal de daño en el DNA (Singh *et al*, 1990). Así mismo, el análisis de 200 personas nativas Italianas (rango de edad 10-85 años), tampoco detectó asociación significativa (Betti *et al*, 1995). Varios estudios poblacionales tampoco han encontrado asociación entre la edad y el daño genético, posiblemente por que los rangos de edad son muy estrechos y oscilan entre los 35-41 años (Zhu *et al*, 2001; Sram *et al*, 1998; Hartmann *et al*, 1998; Betti *et al*, 1994; Valverde *et al*, 1997; Pitarque *et al*, 1999).

Pocas publicaciones reportan un pequeño efecto modulador de la edad en los niveles de daño genético identificado mediante el ensayo cometa. Un estudio realizado por Singh *et al* 1991, detectó un incremento de daños en el DNA sobre el nivel basal del 12% en

individuos mayores de 60 años, comparados con individuos menores de 60 años. Similarmente, en Grecia, el estudio de 80 individuos (rango de edad 55-60 años) estableció un incremento del 14.5% de daños en el DNA en las personas más viejas (Piperakis *et al*, 1998). Un efecto similar fue observado en hepatocitos de ratas, en las que las células de mayor daño genético estaban asociadas con ratas de mayor edad, sin embargo el nivel basal de daño no estaba asociado con la edad (Higami *et al*, 1994).

El presente estudio no encontró asociación lineal significativa entre los parámetros de cuantificación de daño de cometa y la edad de los 60 sujetos de estudio ($p > 0.05$); lo cual concuerda con la mayoría de publicaciones de cometa referidas anteriormente. En general, la influencia de la edad en los valores de cometa han sido atribuidos a una mayor actividad física en las personas más jóvenes (que puede enmascarar el efecto observable en personas mayores) y al daño oxidativo de las muestras de sangre producto de la manipulación (Faust *et al*, 2004a). La hipótesis de la acumulación de daños y degeneración de los sistemas de reparación a través del tiempo no ha sido propuesta como causal del incremento de daños en ninguna de las publicaciones de cometa revisadas; pues la información existente en torno a la influencia de la edad sobre el daño genético detectado por cometa es contradictoria, controversial y poco concluyente (Heuser *et al*, 2005; Heuser *et al*, 2007; Moller *et al.*, 2006). Una vez el ensayo de cometa haya superado la etapa de caracterización del proceso de validación como biomarcador de exposición y las fuentes externas de influencia y factores de confusión sean manejables, podrá atribuirse certera causalidad a la influencia de la edad sobre el nivel de daño genético tanto para este y otros estudios.

El tiempo de exposición ocupacional puede tener efecto sobre el nivel de daños genético bajo la hipótesis de que las personas expuestas por más tiempo a un agente carcinogénico o mutagénico presentan mayores daños tanto por una permanente inducción como por una acumulación de los mismos. En general, son pocos los estudios que incluyen el tiempo de exposición como variable de estudio, de ahí que la información disponible sea contradictoria. El tiempo de exposición a pesticidas no fue relacionado con un incremento de daños citogenéticos o de lesiones reparables del DNA detectadas a través del ensayo cometa (Hoyos *et al*, 1996, Ündeger and Basaran, 2002; respectivamente); sin embargo la exposición ocupacional a Plomo fue asociada significativamente con daños citogenéticos (Pinto *et al*, 2003); bajo la hipótesis de disminución o inhibición de la capacidad de reparación de las células como respuesta a una exposición crónica.

En este trabajo, el tiempo de exposición a pinturas y solventes orgánicos no fue asociado linealmente con la longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola ($p > 0.05$), indicando que el tiempo de exposición no influye en los daños del DNA revelados en la prueba del cometa. Este resultado puede explicarse con relación a lo propuesto por Godderis *et al* (2004), quienes demuestran que la exposición constante de trabajadores al Estireno induce y acelera procesos de reparación celular ante la inducción de daño en linfocitos de sangre periférica de esta población tratados *in vitro* con oxido de estireno. La constante exposición

a agentes químicos parece mantener a los linfocitos en estado de alerta de ahí que el tiempo de exposición no estaría relacionado con una degeneración de estos sistemas, sino de su activación ante las amenazas constantes de daño genético. Este caso particular podría explicar los resultados obtenidos con respecto a la exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas de la población analizada en este estudio.

Aunque los resultados de este estudio proveen evidencia de daños en el DNA de linfocitos de pintores de carros, no puede asegurarse cuál de los químicos de exposición es responsable del incremento en la longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola, ya que, como en muchos otros estudios, la exposición se está presentando a una mezcla de solventes orgánicos. Si se tiene en cuenta que los resultados obtenidos están influenciados por las condiciones particulares de exposición de los trabajadores (por ejemplo el no uso de medidas de protección durante la ejecución de sus labores), este estudio se constituye en herramienta valiosa para tomar decisiones acerca de dirigir medidas educativas y de control con el propósito de minimizar la exposición futura a agentes tóxicos en los lugares de trabajo. La socialización de estos resultados con comisiones de seguridad social, entes gubernamentales regionales, como alcaldías, y nacionales como el Ministerio de Trabajo permitirá proponer la formulación de actos legislativos dirigidos tanto al diseño y aplicación de programas de vigilancia epidemiológica ocupacional (VEO) de poblaciones expuestas como a la regulación de los límites legales de exposición a sustancias químicas en los lugares de trabajo.

10. CONCLUSIONES

La metodología de cometa (alcalina), calibrada para la determinación de daños en el DNA de linfocitos de sangre periférica de pintores expuestos ocupacionalmente, fue reproducible en las condiciones del laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca.

El ensayo de cometa es un método muy sensible para detectar lesiones primarias del DNA en trabajadores expuestos ocupacionalmente a sustancias o mezclas complejas de sustancias químicas.

En las condiciones de laboratorio dadas para este estudio, puede asegurarse que los pintores de carros de la ciudad de Popayán presentaron una exposición a solventes orgánicos y pinturas manifestada como un incremento de daños reparables del DNA detectados mediante el ensayo cometa alcalino y cuantificados a través de los parámetros longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola.

Los resultados obtenidos en este estudio soportan la genotoxicidad del Benceno, Xileno, Tolueno y Plomo; sustancias químicas contenidas en solventes, mezclas de solventes (*thinner*) y pinturas utilizados por la población estudiada.

La edad de los individuos y el tiempo de exposición (años) a pinturas y solventes orgánicos no se asocian significativamente con un aumento de daños en el DNA de linfocitos de la población estudiada, es decir, los valores de longitud, momento y porcentaje de DNA en la cola no son directamente proporcionales al incremento de estas variables independientes.

Los daños en el DNA detectados en los pintores de carros sugiere que la exposición ocupacional a pinturas y solventes implica un riesgo para la salud, por lo que deben implementarse medidas de control, que incluyan actividades educativas acerca del uso y manejo de medidas de protección en los lugares de trabajo con el fin de minimizar exposiciones futuras.

La realización de este proyecto me ha permitido adquirir nuevo conocimiento científico que ha sido de gran aporte al fortalecimiento de mis competencias propositivas e investigativas; en virtud de lo cual, considero, me encuentro capacitada para la ejecución y evaluación de nuevos proyectos investigativos en el área de la toxicología genética y citogenética.

11. IMPACTO

11.1. SOCIAL

Las mayores implicaciones de este estudio están en función de la promoción de la salud y la prevención de enfermedades, pues los resultados obtenidos serán socializados a los que colaboraron con este estudio y a personas interesadas, a través de seminarios o charlas que incluyan una descripción de los objetivos, la metodología y los productos obtenidos; con el propósito de dar a conocer los riesgos de salud atribuibles a la exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas, y el posible riesgo de padecer enfermedades a largo plazo, como cáncer. Se busca, pues, crear conciencia sobre la prevención y educar con el fin de minimizar exposiciones futuras. El propósito es producir un impacto positivo y mejorar la calidad de vida de la población implicada.

11.2. CIENTIFICO

Este estudio ha generado información novedosa acerca del daño genético (rupturas de cadena sencilla, doble, sitios lábiles al álcali, *crosslinks* de DNA y sitios AP o intermedios de reparación) causado por la exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas. Dicho conocimiento tiene impacto no sólo a nivel regional, por ser el primer estudio en su tipo realizado en la ciudad de Popayán, sino también a nivel nacional, ya que este tipo de exposición no se ha evaluado través de la prueba del cometa. Si se tiene en cuenta que la problemática de exposición que se presenta en Popayán (ausencia de medidas de protección, lugares de poca ventilación, etc) se está dando en también en toda Colombia e incluso en otros países, los resultados obtenidos pueden ser usados como una guía para extrapolar del riesgo a otras poblaciones expuestas de forma similar. En adición, los resultados obtenidos permiten ampliar aún más la literatura científica que existe acerca de los solventes orgánicos, específicamente de su genotoxicidad en poblaciones expuestas ocupacionalmente.

Es importante resaltar que la validez y reproducibilidad de la metodología propuesta en este estudio sienta las bases para la realización de otros similares en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, de tal forma que a largo plazo puede contribuir a la ampliación del conocimiento científico en el área de la exposición ocupacional. Por demás, este estudio es un aporte al proceso de validación que actualmente atraviesa el ensayo de cometa, especialmente en el área del monitoreo biológico o ensayo *ex vivo*.

12. RECOMENDACIONES

Dado que los solventes orgánicos pueden causar daños en el DNA a través de la oxidación de bases nitrogenadas, sería pertinente introducir en el ensayo cometa la digestión intermedia con enzimas de lesión específicas, como Endonucleasa III y Formamido Pirimidin Glicosilasa, que inducen rupturas en la hebra de DNA en los sitios donde se encuentran pirimidinas y guaninas oxidadas, respectivamente. Esta modificación permitirá considerar los resultados obtenidos como biomarcadores de daño oxidativo, además de biomarcadores de exposición genotóxica.

Para otros estudios, sería interesante incluir biomarcadores de exposición externa que evalúen la concentración de solventes en el aire, además de biomarcadores de exposición interna, tales como la determinación de las concentraciones en orina de los ácido t-t-Mucónico, Hipúrico y metil-Hipúrico; metabolitos excretables del Benceno, Tolueno y Xilenos; con el fin de confirmar los nivel de exposición ocupacional de los trabajadores a estas sustancias; correlacionar estos datos con los parámetros de cuantificación de cometa y proponer soluciones que incluyan la reducción de vapores de solventes en los lugares de trabajo, teniendo en cuenta los límites legales de exposición establecidos a nivel internacional (ACGIH-Valores límite de Threshold)

Los resultados de varias publicaciones con el ensayo cometa han mostrado estar muy correlacionados con otras pruebas citogenéticas como MN; AC e ICHs, indicando que los hallazgos fueron en verdad positivos o negativos. Un gran aporte a la evaluación de daños en el DNA de poblaciones ocupacionalmente expuestas sería la implementación metodológica de biomarcadores de efectos tempranos, con el fin de confirmar que el daño no reparado, detectado con cometa, es conducente a la fijación de daños permanentes en la célula, que pueden estar asociados a eventos tempranos en el origen de enfermedades como el cáncer. Muchos xenobióticos son metabolizados por enzimas polimórficas asociadas a la modulación del daño genético; de ahí que otra implementación interesante sería la evaluación de la influencia de los polimorfismos genéticos como biomarcadores de susceptibilidad, siempre y cuando la muestra poblacional sea incrementada en número.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTINI, R *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. En: Mutation Research. Vol. 463 (2000); p. 111-172.

ALOK, P *et al.* DNA damage in lymphocytes of rural Indian women exposed to biomass fuel smoke as assessed by the comet assay. En: Environmental and molecular mutagenesis. Vol. 45 (2005); p. 435-441.

ANDERSON, D; YU, T. and SCMEZER, P. An investigation of the DNA damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. En: Environmental and molecular mutagenesis. Vol. 26 (1995); p. 305-314.

ANGELIS, K; DUSINSKA, M. and COLLINS, A. Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. En: Electrophoresis. Vol. 20 (1999); p. 2133-2138.

_____ ARP-ISS. Sistema de vigilancia epidemiologica a expuestos a solventes organicos. 1998. Disponible por internet: <URL: [http:// www. Ins.gov.co/laboratorio/sambiental/sa_lineasi](http://www.Ins.gov.co/laboratorio/sambiental/sa_lineasi)>

_____ ASTDR Agency for toxic substances and disease registry, ToxFAQs, toxicological profile for: 2-butanone (1995). N-hexane (1999). Toluene (2001). Acetone (2002). Disponible por internet. <URL:<http://www.astdr.cdc.gov/toxfaq.html>>

AU, William. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. En: Occupational medicine. Vol. 6 (1991); p. 597-609.

AVISHAI, N; RABINOWITZ, C. and RINKEVICH, B. Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 42 (2003); p. 155-165.

BAJPAYEE, M *et al.* Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of healthy Indian population using the alkaline comet assay. En: Mutation Research. Vol. 520 (2002); p, 83-91.

BAUCHINGER, M *et al.* Chromosome changes in lymphocytes after occupational exposure to toluene. En: Mutation Research. Vol. 102 (1982); p, 439-445.

BAUER, E *et al.* The distribution of the tail moments in a single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (X^2) not a gaussian distribution. En: Mutation Research. Vol. 398 (1998); p, 101-110.

BETTI, C *et al.* Micorgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human. En: Mutation Research. Vol 307 (1994); p. 323-333.

_____, C *et al.* Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. En: Mutation Research. Vol. 343 (1995); p, 201-207.

BONASSI, S; NERI, M. and PUNTONI, R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. En: Mutation Research. Vol. 480-481 (2001a); p, 349-358.

_____, E *et al.* Human MicroNucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. En: Environmental and molecular mutagenesis. Vol. 37 (2001b); p. 31-45.

_____, E *et al.* Human MicroNucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. En: Environmental and molecular mutagenesis. Vol. 37 (2001b); p. 31-45.

BRATSCH, H. and NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. En: Cancer Detection and Prevention Journal. Vol. 28 (2004); p, 385-391.

BRAUBTAR, N. and WILLIAMS, J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. En: International Journal of Hygiene and Environmental Health. Vol. 205 (2002); p. 479-491.

BRENDLER, S et al. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. En: Mutagenesis. Vol. 20 (2005); p, 245-254.

BUSTAMENTE, O et al. Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá. En: Rev. Salud Pública. Vol. 9 (2007); p, 275-288.

CARERE, A et al. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. En: Mutation Research. Vol. 518 (2002); p, 215-224.

CHOUCROUN, P et al. Comet assay and early apoptosis. En: Mutation Research. Vol. 478 (2001); p. 89-96

COK, I et al. Assessment of DNA damage in glue sniffers by use of the alkaline comet assay. En: Mutation Research. Vol. 557 (2004); p, 131-136.

COLLINS, A et al. The comet assay: what can really tell us?. En: Mutation Research. Vol. 375 (1997); p, 183-193.

_____ The comet assay for DNA damage and repair. En: Molecular biotechnology. Vol. 26 (2004); p, 249-261.

COSTA, C et al. *In Vitro* evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. En: Toxicology in Vitro. Vol. 20 (2006); p, 324-331.

DANADEV, K et al. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. En: Toxicology. Vol. 187 (2003); p, 183-193.

DE BOECK, M et al. Validation and implementation of an internal analysis standard in comet assay analysis. En: Mutation Research. Vol. 469 (2000); p, 181-197.

DEAN, B. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xilenes and phenols. En: Mutation Research. Vol. 154 (1985); p, 153-181.

DENNISON, J et al. Occupational exposure limits in the context of solvent mixtures, consumption of ethanol, and target tissue dose. En: Toxicology and Industrial Health. Vol. 20, No. 6-10 (2004); p. 165-75.

_____ EPA. Hazardous Waste Management System; Identification and Listing of Hazardous Waste; Paint Production Wastes; Land Disposal Restrictions for Newly Identified Wastes; CERCLA Hazardous Substance Designation and Reportable Quantities; Designation of n-Butyl Alcohol, Ethyl Benzene, Methyl Isobutyl Ketone, Styrene, and Xylenes as Appendix III Constituents; Addition of Acrylamide and Styrene to the Treatment Standards of F039; and Designation of Styrene as an Underlying Hazardous Constituent. 2001. Disponible por internet. <URL:<http://www.epa.gov/EPA-WATER/2001/february/day-13/w3087.htm>>

FARMER, P. et al. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. En: Mutation Research. Vol. 544 (2003); p, 397-402.

FAUST, F et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. En: Mutation Research. Vol. 556 (2004a); p. 209-229.

_____, F et al. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. En: Toxicology. Vol. 198 (2004b); p, 341-350

FENECH, M et al. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. En: Mutagenesis. Vol.14 (1999); p, 605-612.

FERON, V; FLEMMING, C and GROTEN, J. Toxicology of chemical mixtures: international perspective. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 106 (1998); p, 1281-1289.

FRACASSO, M *et al.* Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. En: Mutation Research. Vol. 515 (2002); p, 159–169.

GAJALAKSHMI, P *et al.* Cytogenetic studies on spray painters in south India. En: Mutation Research. Vol. 514 (2002); p, 1–6.

GICHNER, T and PLEWA, M. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. En: Mutation Research. Vol. 401 (1998); p, 143–152.

GLATT, H and WITZ, G. Studies on the induction of gene mutations in bacterial and mammalian cells by the ring-opened benzene metabolites trans, trans-muconaldehyde and trans,trans muconic acid. En: Mutagenesis. Vol. 5 (1990); p, 263-266.

GODDERIS; L *et al.* Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. En: Environmental and molecular mutagenesis. Vol. 44 (2004); p, 293-303.

GREENBERG, M. The central system and exposure to toluene: a risk characterization. En: Environmental Research. Vol. 72 (1997); p, 1-7.

GROOT, H; SICARD, D and TORRES, M. DNA damage and repair in cells of lead exposed people. En: American Journal of Industrial Medicine. Vol. 38 (2000); p, 151-160.

GROVER, P *et al.* Evaluation of genetic damage on workers employed in pesticide production utilizing comet assay. En: Mutagenesis. Vol. 18 (2003); p, 201-205.

GUTIERREZ, R y CINTAS, P. 55 respuestas a dudas típicas de estadística. 1 ed. España : Díaz de Santos, 2004. 3-4; 25-27p.

HARTMANN, A *et al.* Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single cell gel) assay. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 32 (1998); p. 17-24.

_____, A *et al.* Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. En: *Mutagenesis*. Vol. 19 (2004); p. 51-59.

HEUSER, V *et al.* Comparison of genetic damage in brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. En: *Mutation Research*. Vol. 583 (2005); p. 85–94

_____, V *et al.* Evaluation of genetic damage in brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect and susceptibility. En: *Toxicology*. Vol. 10.1016 (2007); p. 1-13. Article in press.

HIDALGO, V y LONDOÑO, E. Daño genético y/o apoptótico inducido *in vitro* por el tñner (mezcla de solventes orgánicos) en linfocitos humanos de sangre periférica evaluado a través del ensayo cometa alcalino. 2007. Trabajo de grado (Biólogos). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

HIGAMI, Y *et al.* An age-related increase in the basal level of DNA damage and DNA vulnerability to oxygen radicals in the individual hepatocytes of male F344 rats. En: *Mutation Research*. Vol. 316 (1994); p. 59-67.

HOFFMAN, H and SPEIT, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. En *Mutation Research*. Vol. 581 (2005); p. 105–114

HOYOS, L *et al.* Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. En: *Environmental Health Perspectives*. Vol. 104 (1996); p. 535-538.

_____, L; CARVAJAL, S y CAJAS, N. Monitoreo biológico, biomarcadores y prevención del cáncer ocupacional. Colombia. Universidad del Cauca. (2002). 6-14p.

_____, L. 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 de genética.

_____, L. Exposición ocupacional, biomarcadores de riesgo de cáncer en los programas de vigilancia epidemiológica ocupacional para la prevención. En: Salud UIS. Vol. 38 (2006); p. 29-39.

HWANG, E and KIM, G. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. En: Toxicology. Vol. 229 (2007); p, 1-10.

IAVICOLI, I; LAURINI, C and CARELLI, G. Occupational exposure to low levels of inorganic and inorganic substances in a chemical plant for the production of terephthalic acid dimethyl ester. En: Microchemical Journal. Vol. 79 (2005); p, 399-404.

ILGAZLI, A *et al.* The effects of *thinner* inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. En: Clinica Chimica Acta. Vol. 343 (2004); p, 141-144.

_____. International agency for research on cancer. Tobacco smoking. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 38 (1986a). Disponible por internet: <URL:<http://www.iarc.fr>>

_____. Some chemicals used in plastics and elastomers, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 39 (1986b). Disponible por internet. <URL:<http://www.iarc.fr>>

_____. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 1-42 (1987). Disponible por internet. <URL:<http://www.iarc.fr>>

_____. Methods of analysis and exposure measurement – benzene and alkylated benzenes, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 10 (1988). Disponible por internet. <URL:<http://www.iarc.fr>>

_____. International agency for research on cancer. Some organic solvents, resins monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 47 (1989). Disponible por internet. <URL:<http://www.iarc.fr>>

IRAVATHY, G *et al.* DNA damage and repair studies in individuals working with photocopying machines. En: IJHG. Vol. 1 (2001); p. 139-143.

JOHNSON, F. The genetic effects of environmental lead. En: Mutation Research. Vol. 410 (1998); p, 123-140.

KASSIE, F; PARZEFALL, W. and KNASMULLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. En: Mutation Research. Vol. 463 (2000); p. 13-31

KONCA, K *et al.* A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. En: Mutation Research. Vol. 534 (2003); p. 15-20.

KUMAR, S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. En: Journal of Occupational Health. Vol. 46, (2004); p.1-19.

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

LAM, T; CHANG, Z. and JIANG, C. Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. En: Mutation Research. Vol. 515 (2002); p, 147-157.

LÖF, A. and JOHANSON, G. Toxicokinetics of organic solvents: a review of modifying factors. En: Critical Reviews in Toxicology. Vol. 28 (1998); p. 571-650.

LYNGE, E; ANTILLA, A. and HEMMINKI, K. Organic solvents and cancer. En: Cancer causes and control. Vol. 8 (1997); p, 406-419.

MATEUCA, R *et al.* Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. En: Toxicology letters. Vol 156 (2005); p. 277-288.

MATTIA, C; LEBEL, C. and BONDY, S. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. En: Biochemical Pharmacology. Vol. 42 (1991); p, 879-882.

MØLLER, P *et al.* The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. En: Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Vol. 9 (2000); p. 1005-1015.

_____, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. En: Mutation Research. Vol. 612 (2006); p, 84-104.

MONEEF; M *et al.* Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity. En: British Journal of Cancer. Vol. 89 (2003); p. 2271-2276.

MONROY, C *et al.* Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. En: Biomédica. Vol. 25 (2005); p. 335-345

MURATA, M; TSUJIKAWA, M. and KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunctions. En: Biochemical and Biophysical Research communications. Vol. 261 (1999); p, 478-483.

NAGALAKSHMI, K. and ONG, T. Occupational exposure to genotoxic agents. En: Mutation Research. Vol. 437 (1999); p, 175-194.

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

OLIVE, P; BANATH, J and DURAND, E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. En: Radiation Research. Vol. 122 (1990); p. 86–94.

ÖSTLING, O. and JOHANSON, K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual Chinese hamster cells. En: Biochemical and biophysical research communications. Vol 123 (1984); p, 291

PALUS, J *et al.* Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. En: Mutation Research. Vol. 540 (2003); p, 19-28.

PECLOVA, D *et al.* Study of the genotoxicity of toluene. En: Archives of Environmental Health. Vol. 55 (2000); p, 268.

PICCIANO, D. Cytogenetic study of workers exposed to benzene. En: Environmental research. Vol. 19 (1979) p, 33-38.

PINTO, D *et al.* Increased cytogenetic damage in outdoor painters. En: Mutation Research. Vol. 467 (2000); p, 105-111.

PIPERAKIS, S *et al.* Effect of smoking and age on oxidative DNA damage of human lymphocytes. En: Carcinogenesis. Vol. 19 (1998); p, 695-698.

_____, S *et al.* Biomonitoring with the comet assay of greek greenhouse workers exposed to pesticides. En: Environmental and Molecular mutagenesis. Vol. 41 (2003); p. 104-110.

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(1999a); p. 115-127.

_____, M *et al.* Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. En: Mutation Research. Vol. 440 (1999b); p, 195-204.

_____, M *et al.* Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 110 (2002); p, 399-404.

PLAPPERT, U; BARTHEL, E. and SEIDEL, H. Reduction of benzene toxicity by toluene. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 24 (1994); p, 283-292.

POPP, W *et al.* Investigations of the frequency of DNA strand breakage and cross-linking and of SCEs frequency in the lymphocytes of female workers exposed to benzene and toluene. En: Carcinogenesis. Vol. 13 (1992); p, 57-61

ROJAS, E; LOPEZ, M. y VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis: methodology and applications. En: Journal of chromatography B. Vol. 722 (1999); p, 225-254.

_____, E *et al.* DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. En: Mutation Research. Vol. 370 (1996); p, 115-120

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

ROTH, M; VIÉGAS, J. and ROTH, D. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. En: Genetics and Molecular Research. Vol. 2 (2003); p, 410-417.

RUNDELL, M; WAGNER, E. and PLEWA, M. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 42 (2003); p. 61-67.

RYDBERG, B. and JOHANSON, K. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. New York. : P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F Fox, Editors. DNA repair mechanism, academic press, 1978. 465p

SILVA, J. and SANTOS-MELLO, R. Chromosomal aberrations in lymphocytes from car painters. En: Mutation Research. Vol. 368 (1996); p, 21-25.

SINGH, N *et al.* DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. En: Mutation Research. Vol. 237 (1990); p. 123-130.

_____, N *et al.* Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. En: Mutation Research. Vol. 256 (1991); p. 1-6.

_____, N. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells. New York : Plenum press, 1996. 243-266p.

SINKO, I *et al.* Effect of cigarette smoking on DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay. En: Reproductive Toxicology. Vol. 20 (2005); p, 65-71.

SKJELBRED, C *et al.* Influence of DNA repair gene polymorphisms of hOGG1, XRCC1 XRCC3, ERCC2 and the folate metabolism gene MTHFR on chromosomal aberration frequencies. En: Mutation Research. Vol. 602 (2006); p. 151-162.

SPANDORFER, M *et al.* Health hazards in drawing and painting. En: Occupational medicine. Vol. 16 (2001); p 535-555.

SRAM, R *et al.* Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. En: Mutagenesis. Vol. 13 (1998); p. 99-103.

SUL, D *et al.* DNA damage in T- and B-lymphocytes and granulocytes in emission inspection and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. En: Mutation Research. Vol. 538 (2003); p. 109-119

_____, D *et al.* DNA damage in lymphocytes of benzene exposed workers correlates with *trans,trans*-muconic acids and breath benzene levels. En: Mutation Research. Vol. 582 (2005); p. 61-70

SURRALLES, J *et al.* Molecular cytogenetic análisis of bucal cells and lymphocytes from benzene exposed workers. En: Carcinogenesis. Vol. 18 (1997); p, 817-823.

SWANEPOEL, J *et al.* Evaluation of DNA damage and DNA repair by the comet assay in workers exposed to organic solvents. En: IOHA- PILANESBERG. Paper G2-2 (2005).

TICE, R *et al.* Single cell/gel comet assay: guidelines for an *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 35 (2000); p, 206-221.

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

TUNCA, B and EGELI, U. Cytogenetic findings on shoe workers exposed long-term to benzene. En: Environmental health perspectives. Vol. 104 (1996); p, 1313-1317.

ÜLKÜ, Ü. and NURSEN, Basaran. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides mixtures by the alkaline comet assay. En: Archives on Toxicology. Vol. 76 (2002); p. 430-436.

VALVERDE, M *et al.* DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 30 (1997); p. 147-152.

VILLANI, P *et al.* Analysis of DNA oxidative damage related to cell proliferation. En: Mutation Research. Vol. 464 (2000); p, 229-237.

WADE, L. Química orgánica. 2 ed. México. : Pearson Education, 1993. 369-370p.

WALPOLE, R. and MYER, R. Probabilidad y Estadística. México : Mc Graw Hill, 1997. 350-362p.

WEINSTEIN, J; SANTELLA, R. AND PERERA, F. The molecular biology and molecular epidemiology of cancer. New York. : Greenwald P, Editors. The science and practice of cancer prevention and control. Marcel-Dekker, 1993.

WOJDA, A *et al.* Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors. En: Journals of Gerontology series a Biological sciences and Medical sciences. Vol 61 (2006); p 763-772.

XU, X *et al.* Benzene exposure, glutathione S-transferase theta homozygous deletion, and sister chromatid exchanges. En: American Journal of Industrial Medicine. Vol. 33 (1998); p, 157-163.

YENDLE, J *et al.* The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. En: Mutation Research. Vol. 375 (1997); p, 125–136.

ZELJEZIC, D. and GARAJ-VRHOVAC, V. Chromosomal aberrations and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. En: Mutagenesis. Vol. 16 (2001); p. 359-369.

ZHU, C *et al.* Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the comet assay. En: Mutation Research. Vol. 444 (1999); p, 1-6.

_____, C; Lam, C. and JIANG, C. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. En: Mutation research. Vol. 491 (2001); p. 173-181.

ZIMMER. H. *et al.* Biological monitoring of experimental exposure to hydrocarbon solvent mixtures. En: Toxicology Letters. Vol. 162 (2006); p, 263-269.

ANEXOS

Anexo A. ENCUESTA CORTA

Daño en el DNA en linfocitos, por exposición ocupacional a pinturas y solventes orgánicos, mediante el ensayo del cometa (alcalino) en Popayán (Cauca)
La información suministrada es CONFIDENCIAL

Encuestador _____ Fecha _____

Sexo: F ____ **M** ____

Nombre: _____ Edad _____

Empresa: _____ Dirección: _____ Tel: _____

Dirección de la casa _____ Tel (casa) _____

Número de años que ha trabajado con pinturas y solventes _____

Fuma cigarrillo? SI _____ NO _____

Hace cuanto tiempo dejó de fumar _____

Consume bebidas alcohólicas? SI _____ NO _____

Con que regularidad _____

Consume algún tipo de drogas psicoactivas? SI _____ NO _____

Ha sufrido hepatitis? SI _____ NO _____

Actualmente se encuentra bajo tratamiento médico? SI _____ NO _____

Ha estado expuesto a radiaciones? SI ____ NO ____ Cuando? _____

Que marca y tipo de pintura utiliza más en su trabajo? _____

Anexo B. ENCUESTA LARGA

Daño en el DNA en linfocitos, por exposición ocupacional a pinturas y solventes orgánicos, mediante el ensayo del cometa (alcalino) en Popayán (Cauca)
La información suministrada es CONFIDENCIAL

Encuestador _____ Fecha _____ Sexo: F _____ M _____
Nombre: _____ Edad _____
Empresa: _____ Dirección: _____ Tel: _____
Dirección de la casa _____ Tel (casa) _____
Celular _____

Número de años que ha trabajado con pinturas y solventes _____
Cuántas horas diarias trabaja? _____
Como considera la ventilación de este lugar _____
Fuma cigarrillo? SI _____ NO _____
Que cantidad de cigarrillos fuma/día _____
Hace cuanto tiempo dejó de fumar _____

Consumo bebidas alcohólicas? SI _____ NO _____
Con que regularidad _____
Aguardiente ___ Ron ___ Cerveza ___ Guarapo ___
Otras? _____

Consumo algún tipo de drogas psicoactivas? SI _____ NO _____
Marihuana ___ Basuco ___ Cocaína ___
Otras? _____
Hace cuanto ya no consume _____

Actualmente se encuentra bajo tratamiento medico? SI _____ NO _____
Por que? _____
Que medicamento consume? _____
Con que frecuencia? Diariamente _____ 1 vez por semana _____
Ha estado hospitalizado por alguna enfermedad? SI ___ NO ___ Cual _____
Cuanto tiempo estuvo hospitalizado? _____
Ha sufrido de meningitis? SI _____ NO _____ Herpes? SI _____ NO _____
Ha sufrido hepatitis? SI _____ NO _____
Ha estado expuesto a radiaciones? SI ___ NO ___ Cuando? _____
En su familia hay algún antecedente de cáncer? SI _____ NO _____
De que tipo _____

Especifique el parentesco. Padre _____ Madre _____ Hermano(a) _____ Primo(a) _____
Tio(a) _____ Abuelo(a) _____

En su familia hay antecedentes: De malformaciones SI _____ NO _____
De retraso mental SI _____ NO _____
Síndrome de Down SI _____ NO _____

En las mujeres de su familia hay antecedentes De abortos SI _____ NO _____
Esterilidad SI _____ NO _____
Parto prematuro SI ___ NO ___
Nace niño muerto SI ___ NO ___

Especifique el parentesco. Madre ___ Hermana ___ Prima ___ Tía ___ Abuela ___

Ha tenido otro trabajo? SI ___ NO ___ Cual? _____

En este trabajo estaba expuesto a químicos? SI _____ NO _____

Cuales? _____

Sufre usted de mareos? SI ___ NO _____

Sufre usted de fatiga? SI ___ NO _____

Sufre usted de dolores de cabeza? SI ___ NO _____

Sufre usted de convulsiones? SI ___ NO _____

Sufre usted de visión borrosa? SI ___ NO _____

Tiene dificultades para distinguir algún color? SI ___ NO _____

Se irrita con facilidad? SI ___ NO _____

Sufre usted de pérdida del equilibrio? SI ___ NO _____

Tiene sueño durante el día? SI _____ NO _____

Cuantos vasos de agua consume usted diariamente? 1 ___ 2 ___ 3 ___ Mas de 3 _____

Con que frecuencia consume usted frutas y/o vegetales? Diario _____ 5 veces/semana _____

3 veces/semana ___ 1 vez semana _____

No consume _____

Que sustancias utiliza con mayor frecuencia? _____

Anexo C. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS Y PINTURAS

Yo _____ con Cédula de Ciudadanía No _____, he sido informado que el Grupo de INVESTIGACION EN TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA de la universidad del Cauca realizara el estudio “**DAÑO EN EL DNA EN LINFOCITOS, POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A PINTURAS Y SOLVENTES ORGÁNICOS, MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA (ALCALINO) EN POPAYÁN (CAUCA)**” en pintores de carros de la ciudad de Popayán. Se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPOSITO DEL ESTUDIO

Determinar si la exposición ocupacional a los solventes orgánicos causa daños en el DNA, con el propósito determinar si el tiempo de exposición y la edad se relacionan con el incremento de daño genético. De esta forma se pueden ejecutar políticas y estrategias de intervención para la prevención temprana del desarrollo de problemas de salud como el cáncer.

YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITO, JUSTIFICACION, METODOLOGIA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO. En este estudio serán seleccionados 30 trabajadores expuestos a solventes orgánicos y 30 personas no expuestas como grupo de control; con el fin de diferenciar, al momento del análisis de los resultados, el tipo de daños que son ocasionados por las pinturas y los solventes. 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 contra mi salud. Sobre la competencia, formación integral y calidad de los investigadores es responsable la Universidad del Cauca. Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados y explicados de manera confidencial al grupo objeto de estudio en forma anónima por parte de la profesora Luz Stella Hoyos. Los datos obtenidos en este proyecto no serán utilizados con otra finalidad al de esta investigación y mi participación en el mismo no será causal de ninguna clase de discriminación social, laboral, económica, política y/o étnica.

REQUERIMIENTOS. Yo, en pleno uso de mis facultades mentales, libre y conciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que este requiere de mi lo siguiente: Contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos, para suministrar información personal referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar. Si soy seleccionado para el estudio debo donar 5mL de sangre tomada de la vena del brazo; sangre que será procesada en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca mediante la prueba de COMETA.

RIESGOS DE PARTICIPACION. Los riesgos potenciales de participación en el estudio son sangrado e infección en el sitio de 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 uso de jeringas y/o tubos y agujas estériles y nuevas. Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se darán a conocer de forma grupal en un seminario, con el propósito de hacer una autorreflexión, luego de haber recibido una serie de conferencias.

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

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

YO ENTIENDO QUE

- Mi participación es completamente voluntaria y que puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo o puedo tomar libremente la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo.
- Esta investigación fue evaluada y aprobada por el Comité de ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca.
- La información recolectada será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de otros participantes para obtener resultados grupales.
- La Universidad del Cauca se compromete a vigilar que el manejo de las muestras de sangre sean realizadas por un profesional experto y autorizado, en forma aséptica para evitar complicaciones.
- Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante o después del estudio, a la profesora Luz Stella Hoyos de la Universidad del Cauca, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética en las carreras 2ª No 1ª 25 Barrio Caldas, Popayán, en los teléfonos 8209800 Ext. 2615.
- La firma del documento del consentimiento informado es requerida para todas las personas participantes en un estudio como 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 pueden presentarse me han sido explicados claramente.
- También entiendo que como mi nombre no será vinculado con los resultados del estudio, la profesora Luz Stella Hoyos y sus coinvestigadores no estarán en la posibilidad de informar a ninguna otra persona sobre mis resultados en la prueba de COMETA
- Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se de a conocer mi nombre.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia; acepto voluntariamente participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico **“DAÑO EN EL DNA EN LINFOCITOS, POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A PINTURAS Y SOLVENTES ORGÁNICOS, MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA (ALCALINO) EN POPAYÁN (CAUCA)”**.

NOMBRE DEL PARTICIPANTE

FIRMA DEL PARTICIPANTE

NOMBRE DEL TESTIGO

FIRMA DEL TESTIGO

LUZ STELLA HOYOS
Directora del proyecto

Anexo D. TABLA MAESTRA-PRUEBA DE VIABILIDAD

PRUEBA DE VIABILIDAD (TRYPAN 0.4%)

Fecha: D ___ M ___ A ___ Experimento No: ___ No muestras: ___ Hora de salida ___ Hora de llegada ___

AZUL DE TRYPAN AL 0.4%
0.2 azul de tripan + 0.8mL de medio

- Mezcla azul +suspensión 0.2
100uL azul + 250uL de suspensión

	Código asignado	# Linfocitos vivos	# Linfocitos muertos	# Linfocitos TOTAL	% viabilidad celular	# linfocitos / mL Linfocitos vivos X 10.000	uL para obtener 4000 cell X 4 $\frac{4000}{\# \text{ linfocitos / mL}}$ X 1000	mL de agarosa X 4 uL de susp - 70 uL
Expuesto 1								
Expuesto 2								
Expuesto 3								
Expuesto 4								
Expuesto 5								
Expuesto 6								
Control 1								
Control 2								
Control 3								
Control 4								
Control 5								
Control 6								

Cálculos:

Células / mL = Linfocitos vivos X 10000
mL para 4000 células = 4000/ # cell/mL