

**ESTIMACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO EN LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA OCUPACIONALMENTE A
SOLVENTES ORGÁNICOS MEDIANTE EL ENSAYO COMETA DE ALTA
EFICIENCIA**

FABIÁN HUMBERTO MARTÍNEZ PERAFÁN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y
CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2013**

**ESTIMACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO EN LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA OCUPACIONALMENTE A
SOLVENTES ORGÁNICOS MEDIANTE EL ENSAYO COMETA DE ALTA
EFICIENCIA**

FABIÁN HUMBERTO MARTÍNEZ PERAFÁN

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

**LUZ STELLA HOYOS GIRALDO PhD.
Directora**

**SILVIO CARVAJAL VARONA Mg.
ELIZABETH LONDOÑO VELASCO Bióloga
Asesores**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y
CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2013**

Nota de Aceptación:

Firma del Director
Luz Stella Hoyos Giraldo PhD.

Firma del Jurado
Edna Lourdes Orozco Calambás Mg.

Firma del Jurado
María V. Ortega Hernández Bióloga

Popayán, 03 de Mayo del 2013

A mis padres y a mi hermano

Por su amor, comprensión, y dedicación

Desde que era pequeño tenía muchas dudas sobre la vida, afortunadamente en el final de mi carrera puedo decir que resolví muchas de ellas, y ahora tengo muchas más.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres por estar siempre a mi lado, brindándome su amor y apoyo incondicional.

A la PhD. Luz Stella Hoyos Giraldo, directora de este trabajo de grado, por su gran aporte en mi formación profesional, y por sus consejos y su ayuda en el desarrollo de esta investigación.

Al Mg. Silvio Carvajal, por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Bióloga Elizabeth Londoño Velazco, por su asesoría, su paciencia y su amistad durante esta última etapa de mi carrera.

A los demás profesores y compañeros del programa de Biología, por sus enseñanzas.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por su colaboración y amabilidad.

También quiero agradecer de forma especial a las personas que siempre han estado a mi lado, que han compartido mis alegrías y me han apoyado en los momentos difíciles, a mi familia, a mis amigos y a ti, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. JUSTIFICACIÓN	15
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 SOLVENTES ORGÁNICOS	19
2.2 METABOLISMO DE LOS SOLVENTES ORGÁNICOS	20
2.3 DAÑO EN EL ADN GENÓMICO POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	21
2.4 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES	22
2.5 LESIONES PRIMARIAS Y CÁNCER	23
2.6 BIOMONITOREO Y BIOMARCADORES	23
2.7 ENSAYO COMETA	24
2.8 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS MOLECULARES Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES	26
3. ANTECEDENTES	27
4. OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVO GENERAL	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. MARCO METODOLÓGICO	35
5.1 TIPO DE ESTUDIO	35
5.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	35
5.3 HIPÓTESIS	35
5.4 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO	36

5.5 SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	37
5.5.1 Criterios de inclusión y de exclusión	37
5.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS	37
5.7 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS	38
5.8 ENSAYO COMETA ALCALINO DE ALTA EFICIENCIA	39
5.8.1 Cultivo y tratamiento de leucocitos para establecimiento de los controles positivo y negativo del ensayo cometa	39
5.8.2 Determinación de la viabilidad celular	39
5.8.3 Ensayo cometa alcalino de alta eficiencia	40
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	43
6. RESULTADOS	44
6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	44
6.2 DAÑO GENÓMICO EN LEUCOCITOS POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A SOLVENTES ORGÁNICOS	45
6.3 ASOCIACIÓN ENTRE EL DAÑO EN EL ADN GENÓMICO, LA EDAD, EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y EL CONSUMO DE ALCOHOL	47
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES	58
9. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS	59
9.1 A NIVEL SOCIAL	59
9.2 A NIVEL CIENTÍFICO	59
10. RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características demográficas de la población objeto de estudio, grupo referente (no expuesto) y grupo expuesto a solventes orgánicos	45
Tabla 2. Porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM) en leucocitos de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto a solventes orgánicos	46
Tabla 3. Asociación entre el daño en el ADN genómico, la edad y el tiempo de exposición, mediante la correlación de Spearman	47
Tabla 4. Porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM) en leucocitos de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto a solventes orgánicos, con relación al consumo de alcohol	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diseño de la distribución de las muestras en microplatos y Gelbond	41
Figura 2. Metodología para el establecimiento del ensayo cometa de alta eficiencia	42
Figura 3. Imágenes de nucleoides, coloración con Bromuro de Etidio, microscopio de fluorescencia (400x)	46

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Estudios de biomonitorio genético en poblaciones expuestas a solventes orgánicos, que utilizan el biomarcador daño en el ADN genómico evaluado mediante el ensayo cometa	28
Cuadro 2. Clasificación de las variables del estudio	36

RESUMEN

Introducción: según la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer, “existe suficiente evidencia en humanos de carcinogenicidad por exposición ocupacional como pintor”. Los pintores están expuestos a mezclas complejas de solventes orgánicos (SO) como el *thinner* 0.14. **Objetivo:** estimar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica en una población expuesta ocupacionalmente a SO en la ciudad de Popayán. **Metodología:** se aislaron leucocitos de sangre periférica de individuos expuestos ($n = 52$) y referentes (no expuestos) ($n = 52$). Se estimó el daño en el ADN genómico mediante el ensayo cometa alcalino de alta eficiencia en Gelbond. Se registraron 100 nucleoides por individuo. Se determinó el porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM), a través del programa Komet 6.0. **Resultados:** se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$; prueba U de Mann-Whitney) entre la mediana del %TDNA (11.09 ± 0.65) y del TM (0.101 ± 0.011) del grupo expuesto con respecto a la mediana del %TDNA (7.29 ± 0.31) y del TM (0.061 ± 0.004) del grupo referente (no expuesto). **Discusión:** el incremento en los parámetros del cometa en el grupo expuesto a SO está asociado con la inducción de lesiones primarias (roturas de cadena sencilla y doble, y sitios lábiles al álcali) por parte de las especies reactivas de oxígeno, productos del metabolismo de los SO. Si estas lesiones son mal reparadas o no reparadas pueden expresar mutaciones que son eventos iniciales en el desarrollo de enfermedades complejas como el cáncer. **Conclusión:** la exposición a SO induce daño genómico en leucocitos de sangre periférica de pintores de carros de la ciudad de Popayán, luego, los pintores son una población en riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con la inestabilidad genómica, y por lo tanto requieren mayor atención por parte de las entidades gubernamentales relacionadas con la promoción de la salud.

Palabras clave: solventes orgánicos, daño genómico, ensayo cometa, Gelbond.

INTRODUCCIÓN

Según la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer: “existe suficiente evidencia en humanos de carcinogenicidad por exposición ocupacional como pintor” (IARC, 1989). Los pintores se encuentran expuestos a una variedad de solventes orgánicos (SO), incluyendo hidrocarburos aromáticos (principalmente tolueno), hidrocarburos alifáticos, cetonas, alcoholes y ésteres. A pesar que la mayoría de estos compuestos, por sí solos, no son considerados como carcinógenos por la IARC, mezclados pueden potenciar el riesgo de desarrollar diversas enfermedades, entre ellas, el cáncer (Cassini et al., 2011). De hecho, la IARC (2012) reporta que este tipo de exposición está asociado con un mayor riesgo de desarrollar mesotelioma, cáncer de vejiga y de pulmón.

En Colombia, la problemática que representa la exposición ocupacional a SO no ha sido lo suficientemente estudiada, lo cual se evidencia en el escaso número de investigaciones que relacionan la exposición a estos compuestos químicos con el desarrollo de problemas de salud, y la inexistencia de programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional (VEO) en poblaciones expuestas a SO. Además, según el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Nacional de Cancerología (2009), en nuestro país no existen registros sobre la incidencia de cáncer ocupacional por este tipo de exposición. En el caso específico de la ciudad de Popayán, se observa un número elevado de pintores de carros, quienes están expuestos a mezclas complejas de SO. Al contemplar las condiciones en las que laboran estos pintores, se evidencia la falta de sistemas de ventilación óptimos en los talleres de pintura, y la carencia de Equipos de Protección Personal (EPPs) eficaces contra la exposición a los SO, lo cual facilita su absorción a través de las vías respiratoria y dérmica. Asimismo, se observa la incapacidad de muchos trabajadores de acceder a los servicios de una Administradora de Riesgos

Laborales (ARL) y/o una Entidad Promotora de Salud (EPS), estas características empeoran la problemática de la exposición ocupacional a los SO.

Algunos estudios epidemiológicos asocian la exposición a los solventes orgánicos (SO) con la inducción de daños en el ADN que se expresan en la célula como Alteraciones Cromosómicas, Micronúcleos e Intercambio de Cromátidas Hermanas (Aksoy et al., 2006; Hoyos-Giraldo et al., 2009; Testa et al., 2005; Zhu et al., 2001). El daño en el ADN está relacionado con el metabolismo de los SO, durante el cual se producen metabolitos como las quinonas, moléculas que mediante procesos de oxido-reducción generan especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales pueden causar estrés oxidativo e inducir daño oxidativo en el ADN (Murata et al., 1999). Entre las EROs, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es especialmente reactivo, éste puede interactuar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa del ADN, lo que origina lesiones primarias como roturas de cadena sencilla y doble, bases oxidadas, y sitiosapurínicos y apirimidínicos (AP) (Dizdaroglu, 2012; Evans et al., 2004). Las lesiones primarias pueden ser reparadas mediante la escisión de bases (REB) en células proliferativas, sin embargo, si estas lesiones son mal reparadas o no reparadas pueden llevar a la expresión de mutaciones, que son consideradas eventos iniciales en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Dizdaroglu, 2005; Wallace et al., 2012).

En este estudio epidemiológico molecular se empleó un biomarcador citogenético molecular de exposición, como lo es el daño en el ADN genómico determinado mediante el ensayo cometa alcalino. Esta es una prueba rápida y sensible, en la cual las células con daño en el ADN, luego de una electroforesis, se evidencian con una forma similar a la de un cometa estelar, con una “cabeza” que representa una concentración de material genético, y una “cola” que expresa la inducción de lesiones primarias en el ADN como roturas de cadena sencilla y doble (Valverde and Rojas, 2009). Existen algunas variantes metodológicas del ensayo cometa convencional, y para esta investigación se empleó una versión optimizada de la

prueba que incorpora el uso de microplatos y de Gelbond (lámina de poliéster). Con esta nueva metodología se pueden manipular hasta 96 muestras en simultánea, por lo tanto se disminuye la variabilidad entre los datos y se aumenta la eficiencia del ensayo (McNamee et al., 2000). Con relación al daño identificado por el ensayo cometa, éste se puede medir a través de parámetros cualitativos y cuantitativos. En este estudio se emplearon los parámetros cuantitativos, porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM), determinados mediante el programa Komet 6.0, el cual disminuye el sesgo en la medición, con respecto al análisis cualitativo del daño en el ADN, que resulta ser subjetivo.

Son pocas las investigaciones que evalúan el daño en el ADN genómico por la exposición ocupacional a los solventes orgánicos (SO) en pintores, mediante el ensayo cometa (Cassini et al., 2011; Martino-Roth et al., 2003; Moro et al., 2012). Por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo “estimar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica en una población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos en la ciudad de Popayán”. Luego, este estudio aporta un conocimiento sobre el daño en genómico causado por la exposición ocupacional a SO, el cual puede ser utilizado para generar un cambio de actitud en la población objeto de estudio, hacia el autocuidado en el lugar de trabajo. Asimismo, pretende alertar y motivar a las instituciones gubernamentales hacia el diseño y ejecución de políticas y estrategias de promoción de la salud y prevención de enfermedades relacionadas con la exposición a SO, como el cáncer. Además, esta investigación hace parte y cumple uno de los objetivos del macro proyecto “Identificación del daño oxidativo o alquilante en el ADN de linfocitos de personas expuestas a solventes orgánicos en el departamento del Cauca”, registrado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, ID: 3606. Por último, este estudio será publicado una revista indexada y se espera que sea tomado en cuenta por el proyecto internacional ComNet, el cual busca la estandarización y la validación del ensayo cometa como un biomarcador confiable para la identificación del daño en el ADN en estudios de biomonitoreo genético humano.

1. JUSTIFICACIÓN

La exposición a solventes orgánicos (SO) es un problema de salud ocupacional a nivel mundial. Este tipo de exposición está asociado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cavidad bucal, laringe, esófago, estómago, hígado, páncreas, próstata, recto, leucemias y linfomas (Alguacil et al., 2002; Lynge et al., 1997; Rêgo et al., 2002). Los pintores de carros están expuestos a diferentes SO, especialmente a tolueno, xileno, cetonas, ésteres de alcoholes y éteres de glicol (Cassini et al., 2011). De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer: “existe suficiente evidencia en humanos de carcinogenicidad por la exposición ocupacional como pintor” (IARC, 1989). Sin embargo, en Colombia no se han realizado suficientes investigaciones que relacionen la exposición ocupacional a SO con el desarrollo de problemas de salud. Por lo tanto, es pertinente el desarrollo de estudios de biomonitorio genético como éste, que permite “estimar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica en una población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos en la ciudad de Popayán”.

En nuestro país, la poca trascendencia que se le ha dado a la problemática de la exposición ocupacional a solventes orgánicos (SO), también se puede evidenciar en la ausencia de registros sobre la incidencia de cáncer ocupacional, y la inexistencia de programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional (VEO) en poblaciones expuestas a SO. Por estas razones, el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Nacional de Cancerología (2009) proponen el Plan Nacional para la Prevención del Cáncer Ocupacional en Colombia, cuya meta es reducir la incidencia de este tipo de cáncer y mejorar la calidad de vida de las personas que por su trabajo son afectadas por la exposición a agentes cancerígenos. Luego, el presente estudio es concordante con la meta mencionada anteriormente, puesto que brinda un conocimiento sobre el daño en el ADN genómico inducido por la

exposición ocupacional a los SO, el cual permite alertar y motivar a las instituciones gubernamentales hacia el diseño y ejecución de políticas y estrategias de promoción de la salud e intervención temprana, que eliminen o reduzcan la exposición ocupacional a agentes potencialmente cancerígenos, como los SO.

Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, la proporción de trabajadores informales en trece ciudades representativas del país, para el trimestre móvil septiembre - noviembre del 2012 fue de 51.6% (DANE, 2013). La mayoría de estos trabajadores informales no están incluidos en el Sistema de Seguridad social Integral Colombiano. En Popayán existe un número elevado de pintores de carros del sector informal, los cuales están expuestos en particular a una mezcla compleja de solventes orgánicos (SO), conocida comercialmente como *thinner* 0.14. Al contemplar las condiciones en las que laboran los pintores, se evidencia la falta de sistemas de ventilación óptimos en los talleres de pintura, y la carencia de Equipos de Protección Personal (EPPs) eficaces contra la exposición dermal y respiratoria a los SO. Asimismo, se observa la incapacidad de muchos trabajadores de acceder a los servicios de una Administradora de Riesgos Laborales (ARL) y/o una Entidad Promotora de Salud (EPS), de igual forma, un bajo nivel socioeconómico y educativo. Estas características empeoran la problemática de la exposición ocupacional a los SO, por lo tanto, se espera que al dar a conocer los resultados de esta investigación a la población objeto de estudio, mediante un curso taller, se genere un cambio de actitud en los pintores de carros y se motive hacia una cultura de promoción de la salud y autocuidado en el lugar de trabajo.

En este estudio el biomarcador utilizado fue el daño en el ADN genómico identificado mediante el ensayo cometa alcalino de alta eficiencia (McNamee et al., 2000), este es un biomarcador citogenético molecular de exposición, rápido y sensible que permite evaluar las lesiones primarias en el ADN (roturas de cadena

sencilla y doble, y sitios lábiles al álcali), causadas por la exposición a sustancias genotóxicas (Burlinson et al., 2007). Por lo tanto, además de cumplir el objetivo general y los objetivos específicos, el presente estudio trató de corroborar que el empleo del ensayo cometa de alta eficiencia en el biomonitoreo genético de poblaciones expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos (SO), permite evaluar de manera confiable los efectos genotóxicos tempranos (lesiones primarias), inducidos por este tipo de exposición. De acuerdo con lo anterior, se podría proponer a este biomarcador y a esta nueva metodología como herramientas útiles para ser implementadas en programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional (VEO), tal y como lo menciona el Plan Nacional para la Prevención del Cáncer Ocupacional en Colombia (Ministerio de la Protección Social and Instituto Nacional de Cancerología, 2009), con el propósito de identificar agentes xenobióticos potencialmente cancerígenos en el lugar de trabajo, como los SO.

En esta investigación se emplearon leucocitos para estimar el daño en el ADN genómico, debido a que son células centinelas que circulan por todo el cuerpo, se encuentran en estado no proliferativo (fase G_0 del ciclo celular) y tienen un largo tiempo de vida media (hasta décadas), de manera que pueden acumular lesiones primarias en el ADN genómico por varios años, tales como roturas de cadena sencilla y doble, y sitios lábiles al álcali, las cuales pueden ser evidenciadas mediante el ensayo cometa alcalino (Dusinska and Collins, 2008; Fracasso et al., 2009).

Diferentes estudios de biomonitoreo genético en poblaciones expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos (SO), han empleado el ensayo cometa convencional (en portaobjetos de vidrio), para la estimación del daño en el ADN genómico. Seis de estas investigaciones analizan el daño genómico de forma cualitativa, por lo que se infiere que no utilizan un programa de análisis de imágenes que disminuya el sesgo durante la medición (Cassini et al., 2011;

Heuser et al., 2005; Heuser et al., 2007; Martino-Roth et al., 2003; Moro et al., 2012; Torres et al., 2008). También se observa que la mayoría de estudios utilizan un tamaño muestral pequeño (menor a 50 individuos), lo que aumenta la variabilidad entre los datos y disminuye el poder estadístico, según las directrices para el monitoreo de los efectos genotóxicos de carcinógenos en seres humanos, propuestas por Albertini y colaboradores (2000). Aunque para el caso específico de Colombia, existen tres reportes que evalúan la exposición ocupacional a SO (Cárdenas-Bustamante et al., 2007; Hoyos-Giraldo et al., 2009; Torres et al., 2008), estos estudios presentan resultados contradictorios entre ellos. Por todo lo anterior, se puede afirmar que existe una brecha en el conocimiento sobre la identificación del daño genómico inducido por la exposición ocupacional a SO, mediante el ensayo cometa de alta eficiencia. Luego, fue pertinente realizar este estudio en la población de pintores de carros de la ciudad de Popayán.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 SOLVENTES ORGÁNICOS

Un solvente es un líquido simple o compuesto, que es volátil bajo aplicación y capaz de disolver un aglutinante, normalmente los solventes utilizados para la preparación de pinturas son de naturaleza orgánica (IARC, 2010). Los solventes orgánicos (SO) son compuestos que comparten una estructura común (al menos un átomo de carbono y uno de hidrógeno), presentan bajo peso molecular, naturaleza lipofílica, alta volatilidad y existen en forma líquida a temperatura ambiente. Estos pueden ser agrupados en compuestos de cadena alifática, tales como *n*-hexano, y en compuestos aromáticos con un anillo de seis carbonos, tales como el benceno o el xileno (Rutchik, 2012). Los SO más comunes en las pinturas son el tolueno, xileno, cetonas, alcoholes, ésteres y éteres de glicol. El benceno se utilizó como solvente de pinturas en el pasado, pero actualmente sólo se encuentra en pequeñas cantidades en algunas pinturas basadas en solventes derivados del petróleo (IARC, 1989). Este tipo de agentes químicos son utilizados de manera rutinaria en la industria por su capacidad para disolver aceites, grasas, resinas, pinturas, caucho y plásticos (Rutchik, 2012), por esta razón, pueden adquirirse en el comercio en diferentes presentaciones.

El *thinner* 0.14 es una mezcla compleja de solventes orgánicos comúnmente utilizado en Colombia por los pintores de carros. Según un análisis de cromatografía de gases PIANO realizado por Ecopetrol, el *thinner* 0.14 está compuesto por: tolueno 21.58%, isobutano 17.45%, m-xileno 15.77%, hexano 11.45%, nonano 8.58%, 2,3-dimetilhexano 6.76%, etilbenceno 8.01%, p-xileno 5.79%, octano 3.55%, o-xileno 0.48%, y aproximadamente 50 compuestos con una masa menor al 1% (Hoyos-Giraldo et al., 2009).

Algunos solventes orgánicos (SO) presentes en las pinturas son hidrocarburos aromáticos como el etilbenceno, el tolueno y el xileno, éstos tienen un carácter liposoluble y presentan propiedades nocivas para los seres humanos, especialmente, debido a su afinidad por el tejido graso del sistema nervioso central y periférico, y la médula ósea (Fonseca Patiño et al., 2011). El efecto tóxico de un solvente orgánico, como de cualquier xenobiótico, depende de la dosis sobre un blanco específico, es decir, el tiempo y la concentración del agente activo en el sitio diana. La absorción de estos compuestos se realiza principalmente a través de la vía pulmonar, dérmica y oral y está relacionada con su solubilidad, siendo los liposolubles, como los hidrocarburos aromáticos, los de más fácil absorción. Los SO ingresan a los pulmones vía aérea y mediante acción alveolar pasan a la sangre. Por otra parte, su absorción percutánea se produce principalmente a través de difusión pasiva, y la tasa de absorción depende del flujo sanguíneo cutáneo. Una vez estos compuestos químicos han ingresado al organismo, interactúan con las células diana, atraviesan la membrana celular y posteriormente son metabolizados en el interior de las mismas (Lof and Johanson, 1998).

2.2 METABOLISMO DE LOS SOLVENTES ORGÁNICOS

Durante la fase I del metabolismo, los solventes orgánicos (SO) son oxidados por enzimas de la superfamilia citocromo P450 (CYP) (Valentine et al., 1996). Durante la fase II, las enzimas pertenecientes a la superfamilia glutatión-S-transferasas (GST), transforman los intermediarios oxidados y altamente reactivos de los solventes orgánicos en metabolitos menos reactivos para su fácil excreción (Kirsch-Volders et al., 2006). Entre los SO que componen el *thinner* 0.14 se encuentra el tolueno, el metabolismo de este compuesto puede llevarse a cabo a través de dos vías, mediante la vía principal, el tolueno se oxida por la transformación del radical metilo a radical carboxilo, el cual es conjugado con

glicina para formar ácido hipúrico y de esta forma se elimina en la orina. Mediante la vía menor, el anillo aromático del tolueno se oxida formando orto-, meta- y para-cresoles, los cuales son hidroxilados y transformados a metilhidroquinona y metilbenzoquinona. Estas quinonas mediante procesos de oxido-reducción generan especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden ser la causa de estrés oxidativo e inducir daño oxidativo en el ADN (Murata et al., 1999). Además, la oxidación enzimática del para-cresol genera un metiluro de quinona, que puede inducir daño en el ADN por alquilación directa, formando aductos (Gaikwad and Bodell, 2003).

Un proceso similar ocurre en el metabolismo del etilbenceno, el cual es principalmente excretado a través de la orina como ácido mandélico y ácido fenilgloxílico. En menor proporción y mediante la oxidación del anillo aromático, el etilbenceno se convierte en 2-etilfenol y en 4-etilfenol, éstos compuestos son hidroxilados dando origen a etilhidroquinona y 4-etilcatecol respectivamente, los cuales pueden generar EROs (IARC, 2000; Midorikawa et al., 2004). De acuerdo a lo anterior, los efectos genotóxicos de los solventes orgánicos están relacionados con la unión covalente de sus metabolitos al ADN (daño alquilante) y la inducción de EROs a partir de sus metabolitos (daño oxidativo).

2.3 DAÑO EN EL ADN GENÓMICO POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Uno de los mecanismos más reconocidos de formación de lesiones en el ADN está relacionado con el estrés oxidativo, causado por el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el organismo, entre ellas el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Lee et al., 2004). Estas moléculas electrofílicas pueden unirse con el ADN a través de enlaces covalentes, debido a su afinidad por los centros nucleofílicos de las bases nitrogenadas que componen este ácido nucleico, especialmente las

purinas. Entre las especies reactivas de oxígeno, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es especialmente reactivo, éste reacciona con las purinas y pirimidinas del ADN por adición a enlaces dobles. Un ejemplo de este tipo de interacción es la formación de la 8-oxo-7,8-dihidroguanina u 8-oxoguanina (8-oxoGua), a partir de la hidratación del catión radical de la guanina o adición del $\cdot\text{OH}$ al carbono número 8 (C8) del anillo de imidazol de la misma (Cadet et al., 2003). Además, el $\cdot\text{OH}$ puede abstraer un radical hidrógeno ($\text{H}\cdot$) del grupo metilo de la timina y de cada uno de los enlaces carbono-hidrógeno (C-H) de la 2'-desoxirribosa. A través de las reacciones mencionadas anteriormente, se generan roturas de cadena sencilla y doble, y sitiosapurínicos y apirimidínicos (AP) en el ADN (Dizdaroglu, 2012; Evans et al., 2004). Los sitios AP son lábiles al álcali, por lo tanto en el proceso de desnaturalización del ensayo cometa, realizado a un $\text{pH} > 13$, se inducen roturas de cadena sencilla en el ADN a partir de éstos.

2.4 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

Los daños ocasionados por las especies reactivas de oxígeno (EROs) y los agentes alquilantes, son considerados como lesiones primarias que normalmente son reparadas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (REB), en células en estado proliferativo. En términos generales, en este tipo de reparación, una ADN glicosilasa reconoce la base anormal y cataliza la escisión hidrolítica del enlace N-glicosil que une la base al azúcar. Después de la generación de un sitioapurínico / apirimídico (AP), las enzimas AP endonucleasas y fosfodiesterasas generan una brecha de un solo nucleótido que contiene un terminal hidroxilo 3' y uno fosfato 5', lo que permite que una ADN polimerasa rellene el vacío con un nuevo nucleótido. Por último, una ADN ligasa sella la unión (Norbury and Hickson, 2001).

2.5 LESIONES PRIMARIAS Y CÁNCER

No siempre las lesiones primarias del ADN son reparadas eficientemente. En ocasiones, polimorfismos en los genes que codifican las proteínas involucradas en los procesos de reparación, sumado a la exposición crónica o aguda a xenobióticos, deficiencias en la alimentación, y la edad, conllevan a una reparación deficiente o no reparación. Estas anomalías traen consecuencias biológicas, en el mejor de los casos, las células optan por la vía de muerte celular, lo cual no representa un peligro para el organismo, pero también puede ocurrir que irregularidades en los sistemas de reparación del ADN y de muerte celular permitan que las lesiones primarias en células proliferativas, se expresen como mutaciones, las cuales son de carácter irreversible y se consideran como eventos iniciales en el desarrollo de enfermedades asociadas con la inestabilidad cromosómica, entre ellas el cáncer (Dizdaroglu, 2005).

2.6 BIOMONITOREO Y BIOMARCADORES

El monitoreo biológico o biomonitorio puede definirse como la medición repetida y controlada de marcadores químicos o bioquímicos en los fluidos, tejidos u otras muestras accesibles de sujetos expuestos en el pasado o en el presente a factores de riesgo químicos, físicos o biológicos en el lugar de trabajo y/o el medio ambiente en general. Según el Instituto de Ciencias de la Salud y Medio Ambiente (HESI, por sus siglas en inglés), el biomonitorio puede ser usado para evaluar no sólo la exposición, sino también, el efecto y la susceptibilidad humana individual a los factores de riesgo en el trabajo, por lo cual se ha convertido en una de las áreas más activas en materia de investigación sobre salud ocupacional (Manno et al., 2010; Needham et al., 2007). Estas estimaciones se realizan a través de biomarcadores, los cuales pueden ser definidos como una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos

normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (He and Yu, 2010). Los biomarcadores también pueden ser considerados como indicadores de eventos celulares y moleculares en los sistemas biológicos que pueden aclarar las relaciones entre los riesgos ambientales, los efectos en la salud humana y los procesos de enfermedad (Dusinska and Collins, 2008).

2.7 ENSAYO COMETA

La técnica conocida actualmente como ensayo cometa comenzó a establecerse a partir del protocolo propuesto por Östling y Johanson (1984), en el cual utilizaban la electroforesis en microgel para evaluar de manera sensible el daño en el ADN de células individuales. El protocolo consistía en embeber las células en agarosa sobre un portaobjetos de vidrio, lisarlas, someter el ADN fragmentado a electroforesis en condiciones neutras (pH 9.5) y teñir con bromuro de etidio. Una célula con migración de ADN se asemeja a un cometa estelar con una concentración de material genético en la “cabeza” y un recorrido difuso de migración del ADN hacia el polo positivo (ánodo) denominado “cola”, lo que indica la inducción de daño genómico. Si la célula no ha sufrido daño en el ADN, se observa la acumulación del material genético en un núcleo carente de membrana nuclear, similar al nucleoide de células procariotas. Esta técnica bajo condiciones de pH neutro, permite especialmente, la detección de roturas de cadena doble en el ADN (Valverde and Rojas, 2009). Con el tiempo se realizaron algunas modificaciones al protocolo inicial, es así como Singh y colaboradores (1988), utilizaron la electroforesis alcalina (pH > 13) para desnaturalizar el ADN y así detectar con mayor eficacia roturas de cadena sencilla y sitios lábiles al álcali, además de las roturas de cadena doble.

Otra modificación de la metodología convencional cambia el uso de portaobjetos de vidrio, en los que sólo se podían depositar una o dos muestras, por una lámina de poliéster flexible y transparente conocida como Gelbond que permite manipular hasta 96 muestras al tiempo. Con el protocolo clásico cada placa de vidrio debía ser procesada por separado, lo cual demandaba mucho tiempo y cuidado para evitar sesgos de manipulación, mientras que con el uso del Gelbond se aumenta la eficiencia sin sacrificar la fiabilidad de la prueba (McNamee et al., 2000). Asimismo, el empleo del Gelbond mejora la adhesión de la agarosa de bajo punto de fusión en la que son inmersas las células durante el desarrollo del ensayo cometa, y disminuye *background* de la fluorescencia con bromuro de etidio, agente intercalante utilizado para la coloración del ADN (Andreoli et al., 1997).

El análisis del daño genómico, expresado en la cola del cometa, se puede realizar mediante métodos cualitativos o cuantitativos. Existen diferentes programas informáticos que miden de forma cuantitativa la fluorescencia del daño en el ADN utilizando diversos parámetros. Los tres parámetros más usados son la longitud de la cola (TL), la intensidad relativa de fluorescencia de la cabeza y la cola (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola o %TDNA), y el momento de cola (TM) que expresa el producto de la longitud de la cola por la intensidad relativa de fluorescencia de la cabeza y la cola. El parámetro más útil es el porcentaje de ADN en la cola, ya que tiene una relación lineal con la frecuencia de roturas, es relativamente poco afectado por valores extremos, y permite la discriminación de los daños en el rango más amplio posible (en teoría, de 0 a 100%) (Collins, 2004).

El ensayo cometa ha sido cada vez más utilizado para el biomonitorio humano, gracias a su capacidad para detectar diferentes tipos de daño en el ADN de células eucariotas expuestas a agentes genotóxicos, y a su fácil aplicación (Albertini et al., 2000). Además, mediante investigaciones que evalúan el daño genómico después de una dosis de radiación ionizante, se ha comprobado que los

resultados del ensayo cometa pueden ser expresados como equivalentes Gy (Gray), de esta forma se logra medir la frecuencia de roturas de cadena de ADN por célula, teniendo en cuenta que 1 Gy de irradiación X o γ (gamma) produce 0.31 roturas por 10^9 Da de ADN celular (Collins et al., 2008). Asimismo, los resultados de esta técnica se pueden correlacionar con otros ensayos para aumentar su eficacia en la evaluación del peligro que representa la exposición a diferentes agentes químicos o físicos (Valverde and Rojas, 2009).

2.8 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS MOLECULARES Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

La epidemiología molecular es un campo muy prometedor, puesto que día a día se están desarrollando nuevas técnicas para hacer frente a la etiología, la susceptibilidad genética y los mecanismos relacionados con la inducción de diferentes enfermedades. En estas investigaciones, el uso de biomarcadores juega un papel clave debido a que aportan información que se puede utilizar para predecir el desarrollo de diversas patologías y para ejecutar programas de prevención de las mismas (Bonassi and Au, 2002). Por consiguiente, estudios epidemiológicos moleculares en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos, como éste, permiten alertar, reflexionar y motivar a las instituciones gubernamentales que controlan la salud de los trabajadores, hacia el diseño y ejecución de políticas y estrategias de promoción de la salud e intervención temprana, que eliminen o reduzcan la exposición ocupacional a agentes potencialmente cancerígenos, como los solventes orgánicos.

3. ANTECEDENTES

Existen estudios que relacionan la exposición a solventes orgánicos (SO) con daño en el ADN mediante biomarcadores diferentes al daño en el ADN genómico determinado mediante el ensayo cometa. Hoyos y colaboradores (2009), por ejemplo, asocian la exposición ocupacional a SO en pintores de carros de la ciudad Popayán, con un incremento en la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (AC). Aksoy (2006) y Testa (2005) asocian la exposición a estos compuestos con un aumento en las frecuencias de AC, Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y Micronúcleos (MN). Por otra parte, Vitali (2006) reporta la relación entre la exposición a los compuestos químicos de las pinturas, con altos niveles de metabolitos de los mismos, en la orina de individuos expuestos.

Al realizar una revisión en algunas bases de datos como Science Direct, ISI Web of Knowledge, Hinari y ProQuest, además de buscar a través de la herramienta de Google Académico, se encontraron algunos artículos de biomonitorio genético en poblaciones expuestas ocupacionalmente a SO, que emplean el ensayo cometa (ver cuadro 1). Sólo uno de los estudios encontrados reporta el uso del Gelbond, sin embargo no siguen las directrices propuestas para la versión de alta eficiencia del ensayo cometa (Andreoli et al., 1997). Seis de ellos reportan el daño genómico de forma cualitativa (categorías de daño), por lo tanto, se infiere que no utilizan un programa de análisis de imágenes que disminuya el sesgo en la medición (Cassini et al., 2011; Heuser et al., 2005; Heuser et al., 2007; Martino-Roth et al., 2003; Moro et al., 2012; Torres et al., 2008). Además, la mayoría utilizan un tamaño muestral pequeño (menor a 50 individuos), lo que aumenta la variabilidad entre los datos y disminuye el poder estadístico (Albertini et al., 2000). Por último, dos investigaciones no muestran una asociación estadísticamente significativa entre la exposición a solventes orgánicos y el daño en el ADN genómico determinado por el ensayo cometa (Cárdenas-Bustamante et al., 2007; Pitarque et al., 1999).

Cuadro 1. Estudios de biomonitorio genético en poblaciones expuestas a solventes orgánicos, que utilizan el biomarcador daño en el ADN genómico evaluado mediante el ensayo cometa

POBLACIÓN (# EXPUESTOS/ # REFERENTES) Y CÉLULAS	FACTOR DE EXPOSICIÓN (TIEMPO DE EXPOSICIÓN)	DAÑO EN EL ADN GENÓMICO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA			REFE-RENCIA	
		PARÁME-TRO(S) DE MEDICIÓN	ASPECTOS METODOLÓGICOS RELEVANTES	RESULTADO		ASOCIACIÓN CON OTRAS VARIABLES
♂ trabajadores en estaciones de gasolina en Italia. (12/12) Linfocitos aislados.	Benceno (media = 0.3 mg/m ³) y metabolitos del benceno. (N.E.)	TM	Uso de Gelbond Film, pero no para la versión del ensayo cometa de alta eficiencia. Registro de 100 nucleoides/ individuo. Análisis de imágenes con Casys-Synoptics, (Cambridge, UK).	↑ sig. en TM en expuestos con respecto a referentes (p=0.028)	Hábito de fumar y edad: no hay correlación (datos no presentados) Consumo de alcohol y tiempo de exposición: no se registraron estas variables.	(Andreoli et al., 1997)
♀ trabajadoras en fábrica de zapatos en Bulgaria. (34/19) Fabrica A: 16 expuestas Fabrica B: 18 expuestas Leucocitos aislados criopreservados.	Tolueno, gasolina, acetona, etilacetato y metilenedifenilo diisocianato ($\bar{X} \pm DE = 12.15 \pm 9.88$ años)	TM y %TDNA.	Uso de portaobjetos. Registro de 100 nucleoides/ individuo Análisis de imágenes con Komet 3.0 (Kinetic Image Analysis Company, UK)	No diferencia sig. (p>0.05) en el TM y %TDNA entre expuestos y referentes.	Hábito de fumar y edad: no hay influencia de estas variables. Consumo de alcohol: no se registró esta variable Tiempo de exposición: no fue analizada la influencia de este factor en el incremento de daño genómico.	(Pitarque et al., 1999)
♂ y ♀ trabajadores en fábrica de manufactura de autobuses en China. (275/71) Expuestos: 120 Soldadores (S), 30 mecánicos (M), 80 pintores (P) y 45 auxiliares (A) (200 ♂ y 75 ♀) Referentes: (40 ♂ y 31 ♀) Linfocitos aislados.	Benceno, tolueno, xileno y humo de soldadura. ($\bar{X} \pm DE$, S= 16.7±10.2 M= 22.7+8.8 P= 16.1+9.1 A=19.7+8.8 años)	TM	Uso de portaobjetos. Registro de 50 nucleoides/ individuo Análisis de las imágenes con software Komet 4.0 (Kinetic Image Analysis Company, UK)	↑ sig en TM en pintores (p=0.002), trabajadores auxiliares (p=0.011) y mecánicos (p=0.044) con respecto a referentes.	Hábito de fumar: efecto independiente sobre TM. Consumo de alcohol y edad: el consumo de alcohol (p = 0.508) y la edad (p=0.185), no tuvieron efecto sobre el TM. Tiempo de exposición: no correlación con el TM (r parcial = 0.023, p = 0.91) Género: efecto marginal sobre TM (p = 0.059)	(Zhu et al., 2001)

N.E.: no específico; TM: momento de cola; %TDNA: porcentaje de ADN en la cola; ↑ sig.: incremento significativo

Cuadro 1. (Continuación)

POBLACIÓN (# EXPUESTOS/ # REFERENTES) Y CÉLULAS	FACTOR DE EXPOSICIÓN (TIEMPO DE EXPOSICIÓN)	DAÑO EN EL ADN GENÓMICO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA				REFE-RENCIA
		PARÁMETRO(S) DE MEDICIÓN	ASPECTOS METODOLÓGICOS RELEVANTES	RESULTADO	ASOCIACIÓN CON OTRAS VARIABLES	
♂ trabajadores con maquinas fotocopiadoras en India (29/26) Para estudios de reparación (10/10) Leucocitos de sangre total.	1,1 bifenil; estirenos; propilbenceno; HPA,s nitrados, ozono y dióxido de nitrógeno. (N.E.)	TL	Uso de portaobjetos. Registro de 50 nucleoides/ individuo Medición de la imagen con micrómetro.	↑ sig (p<0.01) en TL de expuestos con respecto a referentes Disminución en la eficiencia de reparación en expuestos con respecto a referentes.	Hábito de fumar: efecto no sig. en ambos grupos. Edad: no efecto sobre el daño genómico Consumo de alcohol: no se registró esta variable.	(Goud et al., 2001)
♂ trabajadores en imprentas de Korea del Sur. (41/ 41) Linfocitos T/B (LT/LB) y granulocitos (G) aislados.	Benceno (4 meses – 25 años)	%TDNA, TM y OTM.	Uso de portaobjetos. Registro de 100 nucleoides/ individuo Análisis de imágenes con Komet 4.0 (Kinetic Image Analysis Company, UK)	↑ sig en %TDNA, TM y OTM en linfocitos B (p=0.0001), linfocitos T (p<0.05; excepto TM, p=0.19), y granulocitos (p=0.0001) entre expuestos con respecto a referentes.	Hábito de fumar y edad: no hay correlación. Consumo de alcohol: no se registró esta variable Tiempo de exposición: no fue analizada la influencia de este factor.	(Sul et al., 2002)
♂ y ♀ trabajadores en fábrica de manufactura de ascensores en China. (205/154) Expuestos: 137 ♂ y 68 ♀ Referentes: 115 ♂ y 39 ♀ (oficinistas) Linfocitos aislados.	Benceno (0.5 - 3.2 mg/m ³), Tolueno (1.2 - 22.3 mg/m ³), Xileno (0.5 - 12.0 mg/m ³) y polvo (0.17 - 1.2 mg/m ³) (N.E.)	TM	Uso de portaobjetos. Registro de 50 nucleoides/ individuo Análisis de imágenes con Komet 4.0 (Kinetic Image Analysis Company, UK)	↑ sig (p < 0.001) en TM en expuestos con respecto a referentes.	Hábito de fumar: ↑ sig (P < 0.001) en TM de fumadores, respecto a no fumadores. Edad: no fue analizada la influencia de este factor. Consumo de alcohol ↑ sig (P < 0.001) en TM en consumidores de alcohol, respecto a no consumidores, pero luego del ajuste para fumadores, esta diferencia no fue sig. Género: ↑ sig. (P < 0.001) en TM en ♂, respecto a ♀.	(Lam et al., 2002)

N.E.: no específico; TL: longitud de la cola; %TDNA: porcentaje de ADN en la cola; TM: momento de cola; OTM: momento de cola olive; ↑ sig.: incremento significativo

Cuadro 1. (Continuación)

POBLACIÓN (# EXPUESTOS/ # REFERENTES) Y CÉLULAS	FACTOR DE EXPOSICIÓN (TIEMPO DE EXPOSICIÓN)	DAÑO EN EL ADN GENÓMICO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA			REFE-RENCIA	
		PARÁMETRO(S) DE MEDICIÓN	ASPECTOS METODOLÓGICOS RELEVANTES	RESULTADO		ASOCIACIÓN CON OTRAS VARIABLES
♂ Trabajadores en talleres de automóviles en Brasil. (20/20) Expuestos: 10 pintores (P) 10 renovadores de batería (RB) Leucocitos de sangre total.	Solventes orgánicos y pinturas (\bar{X} , rango) (P = 12.3, 4-38 años) (RB = 10.2, 3-38 años)	TL, Categorías visuales de daño en el ADN (0-4) e ID.	Uso de portaobjetos 100 nucleoides/individuo. Medición de la imagen con micrómetro	↑ sig ($p < 0.001$) en TL de expuesto con respecto a referentes. ↑ sig ($p < 0.001$) en valores de ID de expuestos con respecto a referentes.	Hábito de fumar: no se realizó el ajuste para análisis estadístico. Edad, tiempo de exposición y consumo de alcohol: no fue analizada la influencia de estos factores.	(Martino-Roth et al., 2003)
♂ trabajadores en manufactura de calzado, en Brasil, expuestos a dos tipos de adhesivos: a base de agua o ABA (16) y a base de solventes o ABS (29) (45/25) Leucocitos de sangre total.	Tolueno, n-hexano, acetona, partículas de degradación de materiales ($\bar{X} \pm DE = 5.80 \pm 4.03$ años expuestos a ABA) ($\bar{X} \pm DE = 3.98 \pm 4.13$ años expuestos a ABS)	Categorías visuales de daño en el ADN (0-4) ID, LI, FD.	Uso de portaobjetos 200 nucleoides/individuo. Medición de la imagen con micrómetro.	↑ sig en el ID, LI y FD obtenido en leucocitos de sangre total de expuestos a ABS con respecto a expuestos a ABA ($p < 0,001$) y a referentes ($p < 0,05$).	Hábito de fumar y consumo de alcohol: no se realizó el análisis estadístico por la baja frecuencia de fumadores y la no diferencia significativa entre grupos. Edad, tiempo de exposición: no fue analizada la influencia de estos factores.	(Heuser et al., 2005)
♂ trabajadores en refinería de petróleo en Portugal (48/30) Leucocitos aislados.	Hidrocarburos derivados del petróleo (benceno, tolueno, xileno) (N.E.)	TL	Uso de portaobjetos Registro de 100 nucleoides/individuo. Análisis de imágenes con QWIN Comet software (Leica Imaging Systems, Cambridge, UK)	↑ sig ($p < 0.05$) de TL en el grupo expuesto, con respecto al referente.	Hábito de fumar y edad: no hay correlación. Consumo de alcohol: no se registró esta variable. Tiempo de exposición: correlación entre tiempo de exposición (> 19 años), y el ↑ TL ($r = 0.34$; $p < 0.01$).	(Roma-Torres et al., 2006)

N.E.: no específico; TL: longitud de la cola; ID: índice de daño; LI: longitud de la imagen del cometa; FD: frecuencia de daño; ↑ sig.: incremento significativo

Cuadro 1. (Continuación)

POBLACIÓN (# EXPUESTOS/ # REFERENTES) Y CÉLULAS	FACTOR DE EXPOSICIÓN (TIEMPO DE EXPOSICIÓN)	DAÑO EN EL ADN GENÓMICO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA				REFERENCIA
		PARÁMETRO(S) DE MEDICIÓN	ASPECTOS METODOLÓGICOS RELEVANTES	RESULTADO	ASOCIACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO CON OTRAS VARIABLES	
<p>♂ y ♀ trabajadores en la manufactura de calzado en Brasil (39/55)</p> <p>Expuestos: 31 ♂ y 8 ♀</p> <p>Referentes: 44 ♂ y 11 ♀</p> <p>Leucocitos de sangre total.</p>	<p>Tolueno, n-hexano, acetona, partículas de polvo, y producto de degradación de materiales.</p> <p>($\bar{X} \pm DE = 4.78 \pm 6.18$ años)</p>	<p>Categorías visuales de daño en el ADN (0-4), ID y FD.</p>	<p>Uso de portaobjetos</p> <p>Registro de 200 nucleoides/ individuo.</p>	<p>↑ sig (P ≤ 0,001). en ID y FD en leucocitos de sangre total de expuestos con respecto a referentes, tanto para hombres como para mujeres.</p>	<p>Habito de fumar: no se analizó por la baja frecuencia de fumadores y la no diferencia sig. entre grupos.</p> <p>Edad y Género: no fue analizada la influencia de estos factores.</p> <p>Consumo de alcohol: no se registró esta variable.</p> <p>Tiempo de exposición: no fue analizada la influencia de este factor.</p>	(Heuser et al., 2007)
<p>♂ y ♀, trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá, Colombia. (33/28)</p> <p>34 ♂ y 27 ♀</p> <p>Leucocitos de sangre total y Linfocitos aislados.</p>	<p>Benceno, tolueno, xileno (contenidos en pinturas), thinner, varsol y bóxer.</p> <p>(mínimo 6 meses)</p>	<p>TL</p>	<p>Uso de portaobjetos</p> <p>100 nucleoides/ individuo</p> <p>Medición de la imagen con micrómetro</p>	<p>No diferencia sig. en el valor de TL entre expuestos y referentes en sangre total.</p> <p>No diferencia sig. en el valor de TL entre expuestos y referentes en linfocitos aislados.</p>	<p>Tiempo de exposición, hábito de fumar, edad, género, y consumo de alcohol: Aunque hubo comparación entre grupos, no fue analizada la influencia de estos factores.</p>	(Cárdenas-Bustamante et al., 2007)
<p>♂ y ♀, trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá, Colombia. (30/60)</p> <p>Expuestos: 27 ♂ y 3 ♀</p> <p>Referentes: 38 ♂ y 22 ♀</p> <p>Leucocitos de sangre total.</p>	<p>Benceno, tolueno, xileno (contenidos en las pinturas), thinner, varsol y bóxer.</p> <p>(mínimo 6 meses)</p>	<p>TL y categorías visuales de daño en el ADN.</p>	<p>Uso de portaobjetos</p> <p>Medición de la imagen con micrómetro.</p>	<p>↑ no sig. (p=0.62) en TL, pero ↑ sig. (p=0.0007) en el % de células con daño medio (19,0%) en expuestos con respecto a referentes.</p>	<p>Tiempo de exposición y hábito de fumar: no fue analizada la influencia de este factor.</p> <p>Edad, género, consumo de alcohol: aunque hubo comparación entre grupos, no fue analizada la influencia de estos factores.</p>	(Torres et al., 2008)

ID: índice de daño; FD: frecuencia de daño; TL: longitud de la cola; ↑ sig.: incremento significativo

Cuadro 1. (Continuación)

POBLACIÓN (# EXPUESTOS/ # REFERENTES) Y CÉLULAS	FACTOR DE EXPOSICIÓN (TIEMPO DE EXPOSICIÓN)	DAÑO EN EL ADN GENÓMICO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA				REFE-RENCIA
		PARÁMETRO(S) DE MEDICIÓN	ASPECTOS METODOLÓGICOS RELEVANTES	RESULTADO	ASOCIACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO CON OTRAS VARIABLES	
<p>♂ trabajadores de la construcción de edificios en Turquía.</p> <p>(52/26)</p> <p>Soldadores: 26 Pintores: 26</p> <p>Linfocitos aislados.</p>	<p>Humo de soldadura, plomo contenido en las pinturas a base de solventes orgánicos.</p> <p>(mínimo 3 años)</p>	%TDNA	<p>Uso de portaobjetos</p> <p>Registro de 100 nucleoides/ individuo.</p> <p>Análisis de las imágenes con BAB Bs200Pro Image Processing and Analysis System of BAB Muh., Turkey.</p>	<p>↑ sig en %DNAT (p<0.01) en expuestos con respecto a referentes.</p> <p>↑ sig en %DNAT (p< 0.01) en soldadores con respecto a pintores.</p>	<p>Habito de fumar: ↑ sig en %TDNA (p<0.01) de fumadores expuestos con respecto a referentes.</p> <p>Edad: no fue analizada la influencia de este factor.</p> <p>Consumo de alcohol: no se registró esta variable.</p> <p>Tiempo de exposición: no diferencia sig. en %TDNA en pintores ni en soldadores (p= 0.571).</p>	(Sardas et al., 2010)
<p>♂ operarios en industria petroquímica (OIP), estaciones de servicio (OES) y mantenimiento de bombas de gasolina (TMBG), en Italia.</p> <p>(82/51)</p> <p>33 (OIP), 28 (OES), 21 (TMBG)</p> <p>Leucocitos de sangre total.</p>	<p>Benceno</p> <p>($\bar{X} \pm DE$: OIP= 25.36+6.12; OES= 14.20+14.13; TMBG= 10.68+10.39 años)</p>	%TDNA, TL, TM y FD.	<p>Uso de portaobjetos</p> <p>Registro de 100 nucleoides/ individuo.</p> <p>El análisis de imágenes mediante software.</p>	<p>↑ sig (p<0.02) en TM, %TDNA y TL de OES, e ↑ sig. (p<0.0001) en TM y TL de OIP, con respecto a referentes.</p> <p>↑ sig (p<0.0001). en FD en OIP con respecto a referentes.</p>	<p>Hábito de fumar: No interfiere con los resultados en ninguno de los grupos.</p> <p>Consumo de alcohol: No se registró esta variable.</p> <p>Tiempo de exposición y edad: No fue analizada la influencia de estos factores.</p>	(Fracasso et al., 2010)
<p>♂ pintores de una industria metalmeccánica en Brasil</p> <p>(33/29)</p> <p>Leucocitos de sangre total obtenida durante una semana de trabajo (lunes en la mañana y viernes en la noche)</p>	<p>Tolueno, xileno, etilbenceno, butilacetato, etilacetato, metil-isobutilcetona, acetona.</p> <p>($\bar{X} \pm EE$: 9.10 ± 1.35)</p>	Categorías visuales de daño en el ADN (0-4) e ID.	<p>Uso de portaobjetos</p> <p>Registro de 100 nucleoides/ individuo.</p>	<p>↑ sig (p < 0.05) en ID de expuestos del viernes), con respecto a referentes.</p>	<p>Hábito de fumar: no incluyen fumadores.</p> <p>Edad: correlación positiva entre el ID en el ADN y la edad (muestras Viernes, r = 0,371, p = 0,034).</p> <p>Consumo de alcohol y tiempo de exposición: no fue analizada la influencia de estos factores.</p>	(Cassini et al., 2011)

%TDNA: porcentaje de ADN en la cola; TL: longitud de la cola; TM: momento de cola; FD: frecuencia de daño; ↑ sig.: incremento significativo

Cuadro 1. (Continuación)

POBLACIÓN (# EXPUESTOS/ # REFERENTES) Y CÉLULAS	FACTOR DE EXPOSICIÓN (TIEMPO DE EXPOSICIÓN)	DAÑO EN EL ADN GENÓMICO MEDIANTE EL ENSAYO COMETA				REFERENCIA
		PARÁMETRO(S) DE MEDICIÓN	ASPECTOS METODOLÓGICOS RELEVANTES	RESULTADO	ASOCIACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO CON OTRAS VARIABLES	
♂ pintores de carros en Brasil (24/19) Leucocitos de sangre total.	Solventes orgánicos y pinturas (46 h por semana, \bar{X} = 25 años)	TM	Uso de portaobjetos 50 nucleoides/ individuo Análisis de imágenes con Comet assay II (Perceptive Instruments, Suffolk, Haverhill, UK)	↑ sig ($p < 0.05$) en TM de expuestos con respecto a referentes.	Habito de fumar: no se realizó análisis por baja frecuencia de fumadores. Edad, tiempo de exposición: no fue analizada la influencia de estos factores. Consumo de alcohol: no se incluyeron bebedores habituales y no se analizó la influencia de este factor.	(da Silva et al., 2012)
♂ pintores industriales en Brasil. (34/27) Leucocitos de sangre total.	Tolueno y solventes de pinturas ($\bar{X} \pm DE = 46.15 \pm 9.94$ meses)	Categorías visuales de daño en el ADN (0-4) e ID.	Uso de portaobjetos Registro de 100 nucleoides/ individuo	↑ sig ($p < 0.001$) en ID de expuestos con respecto a referentes.	Hábito de fumar y consumo de alcohol: no diferencia sig. con respecto al daño genómico. Edad: correlación con ID ($r^2 = 0.27$; $p < 0.05$). Tiempo de exposición: correlación con ID ($r^2 = 0.55$; $p < 0.001$).	(Moro et al., 2012)

TM: momento de cola; ID: índice de daño; ↑ sig.: incremento significativo

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estimar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica en una población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos en la ciudad de Popayán.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica (porcentaje de ADN en la cola y momento de cola), en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos y el grupo referente (no expuesto), mediante el ensayo cometa de alta eficiencia.

Asociar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica (porcentaje de ADN en la cola y momento de cola), con el tiempo de exposición, en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos.

Asociar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica (porcentaje de ADN en la cola y momento de cola), con la edad y el consumo de alcohol, en el grupo expuesto ocupacionalmente a solventes orgánicos y el grupo referente (no expuesto).

5. MARCO METODOLÓGICO

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio epidemiológico molecular de corte transversal, analítico, observacional, en un grupo de individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y un grupo de individuos referentes (no expuestos), en la ciudad de Popayán.

5.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio fue grupo de pintores de carros de la ciudad de Popayán, expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos, y que habían participado anteriormente en otros estudios de biomonitorio genético realizados por el Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. La muestra estuvo integrada por 52 individuos expuestos a solventes orgánicos y 52 individuos referentes (no expuestos).

5.3 HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en el presente estudio fue: si la exposición ocupacional a solventes orgánicos induce daño en el ADN genómico, se espera que el valor de la mediana de daño en el ADN genómico (expresado como porcentaje de ADN en la cola y momento de cola) en leucocitos humanos del grupo de individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos, sea significativamente mayor que el valor de la mediana de daño en el ADN genómico estimado para el grupo de individuos referentes (no expuestos) (H_1). De lo contrario, el valor de la

mediana de daño en el ADN genómico (expresado como porcentaje de ADN en la cola y momento de cola) en leucocitos humanos del grupo de individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos, será igual o menor que el valor de la mediana de daño en el ADN genómico estimado para el grupo de individuos referentes (no expuestos) (H_0).

5.4 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

Luego de identificar el problema, se definieron y clasificaron las variables (ver cuadro 2) para plantear los objetivos de esta investigación.

Cuadro 2. Clasificación de las variables del estudio

Variable	Tipo de variable	Naturaleza	Escala de medición	Niveles	Dato	Medida de Frecuencia o Resumen
Exposición	Independiente	Cualitativa	Nominal	1. Expuesto 2. No expuesto	Si/No	Frecuencia absoluta
Edad	Independiente	Cuantitativa	Razón	Años	Años	Media aritmética
Tiempo de Exposición	Independiente	Cuantitativa	Razón	Años	Años	Media aritmética
Uso de Equipos de Protección Respiratoria (EPRs)	Independiente	Cualitativa	Nominal	1. Uso 2. No uso	Si/No	Frecuencia absoluta y relativa
Consumo de alcohol	Independiente	Cualitativa	Nominal	1. Consumidor 2. No consumidor	Si/No	Frecuencia absoluta y relativa
Daño basal en el ADN genómico	Dependiente	Cuantitativa	Razón	NA	% ADN en la cola	Mediana
					Momento de cola	Mediana

NA = No aplica

5.5 SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Para seleccionar a los individuos que participaron en el estudio, primero se acordó su participación voluntaria, luego se les realizó una encuesta, mediante la cual se obtuvo información personal sobre el estado de salud, estilo de vida, antecedentes familiares y de exposición a los solventes orgánicos. De acuerdo con los datos obtenidos en la encuesta y según los criterios de inclusión y de exclusión, se conformó una muestra poblacional integrada por un grupo de 52 individuos expuestos a solventes orgánicos, los cuales fueron emparejados por edad (± 2 años) con un grupo de 52 individuos referentes (no expuestos).

5.5.1 Criterios de inclusión y de exclusión. Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta para la selección de los grupos de estudio, tanto del grupo expuesto como del referente (no expuesto), fueron: ser individuos saludables con edad entre 18-50 años. Además, para los individuos que hicieron parte del grupo expuesto, tener un tiempo de exposición a solventes orgánicos mínimo de 5 años.

Los criterios de exclusión, tanto para el grupo expuesto como el grupo referente (no expuesto), fueron: ser fumadores o ex fumadores, estar bajo tratamientos de químicos o de radioterapia, y haber recibido radiación a rayos X en un tiempo menor o igual a 4 meses antes de tomar la muestra de sangre. Asimismo, para los individuos que hicieron parte del grupo referente (no expuesto), haber estado expuestos a solventes orgánicos en el lugar de trabajo.

5.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

A los individuos seleccionados para esta investigación se les informó sobre el objetivo, el propósito, los posibles riesgos, los beneficios y el impacto social del

estudio, para qué se utilizarían sus muestras biológicas, y el manejo confidencial de los datos que suministraron. Además, se les indicó que las muestras de sangre serían tomadas por personal capacitado y se les advirtió sobre los posibles riesgos durante y después de la toma de la muestra. Luego de brindarles esta información, los individuos firmaron voluntariamente el consentimiento informado para participar en el macro proyecto: “Identificación del daño oxidativo o alquilante en el ADN de linfocitos de personas expuestas a solventes orgánicos en el departamento del Cauca”, el cual cuenta con el aval del Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca y de la Universidad del Valle. Este consentimiento cumple con las normas científicas, técnicas y administrativas, y con los principios éticos para la investigación médica en humanos, propuestos tanto a nivel nacional, Resolución número 8430 de 1993 (Ministerio de Salud, 1993), como a nivel internacional, Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2008).

5.7 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS

Las muestras de sangre fueron colectadas de forma aséptica, por personal capacitado, en horas de la mañana (8:00 – 11:00 AM), para evitar la posible sobreexpresión de daño en el ADN genómico a causa de una jornada laboral larga con actividad física constante (Mastaloudis et al., 2004). Se colectaron 5 mL de sangre por venopunción en vacutainers con el anticoagulante EDTA, posteriormente, las muestras fueron transportadas en cadena de frío al Laboratorio del Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética (GTGC) de la Universidad del Cauca, donde se aislaron los leucocitos de cada individuo, mediante gradiente de densidad empleando histopaque.

5.8 ENSAYO COMETA ALCALINO DE ALTA EFICIENCIA

El protocolo básico que se usó para el desarrollo del ensayo cometa fue el propuesto por Singh (1988), utilizando un pH>13, con algunas modificaciones para un estudio de biomonitorio genético (Collins and Dušinská, 2002; Dusinska, 2000; Rojas et al., 1999) y el procedimiento en láminas de Gelbond para aumentar la eficiencia de la prueba (McNamee et al., 2000).

5.8.1 Cultivo y tratamiento de leucocitos para establecimiento de los controles positivo y negativo del ensayo cometa. Un día antes de iniciar el ensayo cometa, se realizaron cultivos de leucocitos aislados de un individuo saludable de 23 años de edad, seleccionado según los criterios de exclusión. Para establecer los cultivos se sembraron en un microplato de 96 pozos aproximadamente 3.0×10^4 leucocitos/pozo, en un volumen final de 170 μ L de Medio RPMI 1640 suplementado con Suero Bovino Fetal, L-Glutamina y Fitohemaglutinina. Luego de 24 horas de cultivo, los leucocitos fueron tratados con Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2 , 40 μ M) y Etilmetanosulfonato (EMS, 2.24 mM), ambas sustancias de reconocida actividad genotóxica (De Boeck et al., 2000; Fairbairn et al., 1995), e incubados por 30 minutos y dos horas respectivamente, a 37 °C. Los leucocitos tratados fueron empleados como controles positivos, mientras que los leucocitos suspendidos en *buffer* fosfato salino (PBS), se utilizaron como control negativo. Después del tratamiento e incubación, las células fueron lavadas con PBS.

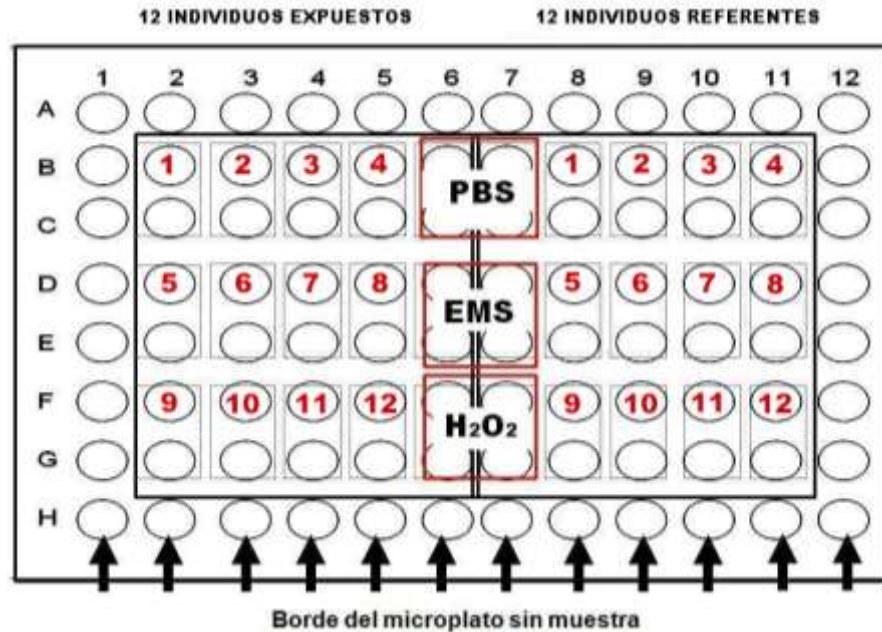
5.8.2 Determinación de la viabilidad celular. En este estudio se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión celular con azul de tripano, para ello se mezclaron en proporción 1:1, azul de tripano (0.1% V/V) y suspensión de

leucocitos, tanto de los controles positivo y negativo del ensayo cometa, como de las muestras de individuos del grupo expuesto y del referente (no expuesto).

5.8.3 Ensayo cometa alcalino de alta eficiencia. Para el ensayo cometa, primero se distribuyeron en un microplato de 96 pozos aproximadamente 1.0×10^4 leucocitos en suspensión por pozo, tanto de los individuos objeto de estudio como de los leucocitos tratados con H_2O_2 y EMS (controles positivos) y los suspendidos en PBS (control negativo). Cada suspensión de leucocitos se mezcló con 90 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) a 37 °C. Se tomaron y depositaron 5 μ L de cada mezcla sobre una lámina de Gelbond (15 cm x 11 cm), colocada sobre una placa de aluminio fría. En la lámina se depositaron las muestras de 12 individuos del grupo expuesto y 12 individuos del grupo referente (no expuesto), con dos réplicas por individuo; asimismo, las muestras de los controles positivos y negativo, con 4 réplicas por control (ver figura 1). Luego, la lámina de Gelbond se mantuvo en refrigeración por 10 minutos a 4 °C, para solidificar la agarosa y formar un gel en el que quedaron inmersas las células (microgel).

Posteriormente, la lámina del Gelbond se sumergió en un *buffer* de lisis (pH=10, NaCl 2.5M, Na_2EDTA 100 mM, Trizma base 10 mM, DMSO 10%, Tritón X-100 1%) durante una noche a 4 °C y en completa oscuridad. Al día siguiente, la lámina se lavó con PBS frío por 5 minutos, se llevó a una cámara electroforética, se sumergió en *buffer* de electroforesis (pH>13; NaOH 10 N, EDTA 200 mM) por 40 minutos a 4 °C, y se corrió una electroforesis durante 30 minutos (28 V; 390 mA). Después, la lámina se lavó 3 veces con *buffer* de neutralización (pH=7.5, Tris base, 0.4 mM) a 4 °C y se fijaron los microgeles con etanol (100%) frío. Luego, el Gelbond se guardó a temperatura ambiente hasta la realización del registro y análisis de los nucleoides.

Figura 1. Diseño de la distribución de las muestras en microplatos y Gelbond

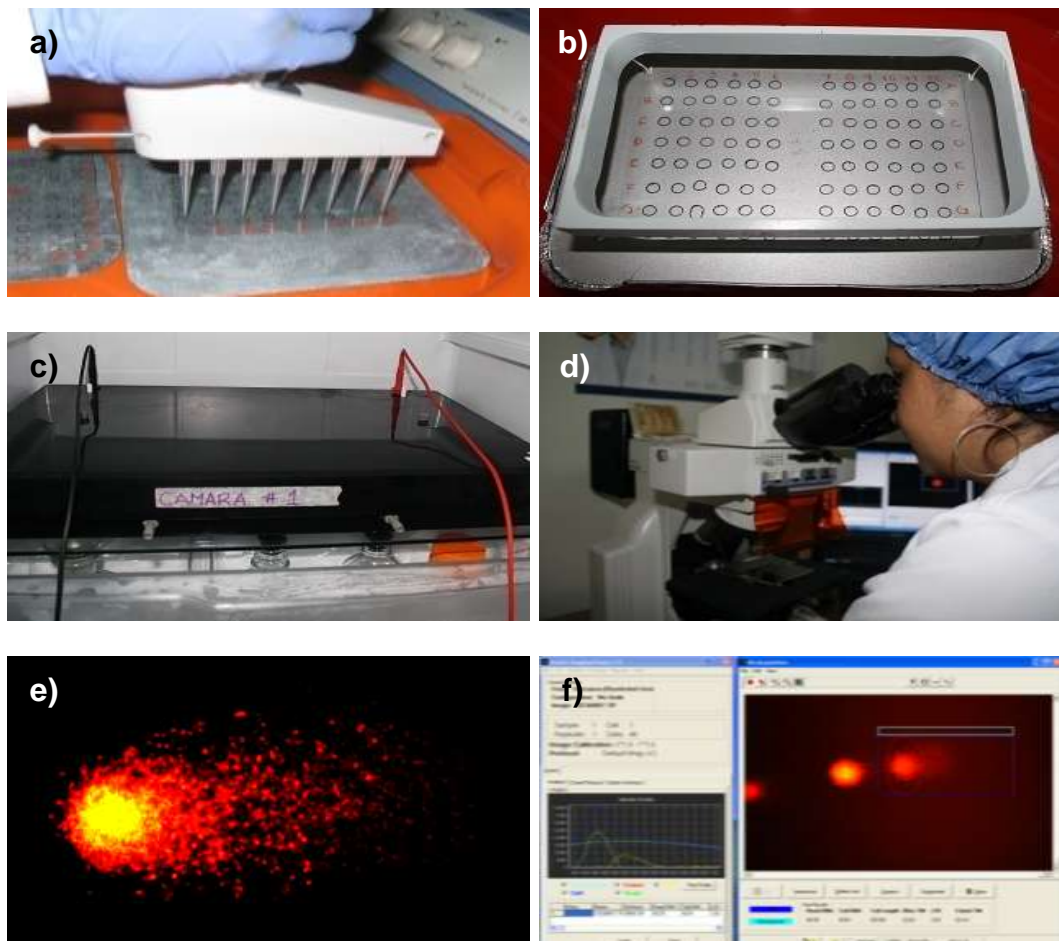


Montaje utilizado para el procesamiento de 60 muestras pertenecientes a 12 individuos expuestos, 12 individuos referentes (2 réplicas por cada individuo) y los controles positivos y negativo del ensayo cometa (4 réplicas por cada control). Los microgeles del borde de la lámina de Gelbond se formaron con agarosa LMA sin leucocitos.

Para el registro de los nucleoides, los microgeles se hidrataron por 20 minutos con agua destilada fría y se tiñeron con 5 μ L de Bromuro de Etidio (20 μ g/mL) por un minuto. Se registraron las imágenes de 50 nucleoides por cada microgel con la cámara Nikon, el programa NIS Elements 3.2 y el microscopio de Fluorescencia Nikon (filtro de excitación BP 546/10 nm, filtro de barrido de 590 nm, lámpara de mercurio). El análisis de las imágenes se realizó con el programa Komet 6.0, y los parámetros seleccionados para cuantificar el daño en el ADN genómico fueron el porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y el momento de cola (TM) (ver figura 2). El procedimiento del cometa sólo fue considerado exitoso, si luego de la

electroforesis no se observó corrimiento del ADN en el control negativo y si por el contrario, se evidenció corrimiento del ADN (daño en el ADN genómico) en los controles positivos.

Figura 2. Metodología para el establecimiento del ensayo cometa de alta eficiencia



a) Depósito de la mezcla (LMA más suspensión celular) sobre el Gelbond; b) Montaje para lisis celular; c) Cámara electroforética para realizar el desenrollamiento y electroforesis del ADN; d) Registro de nucleoides con microscopio de fluorescencia; e) Nucleoide coloreado con Bromuro de Etidio; f) Análisis de imágenes con el programa Komet 6.0.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En este estudio la unidad de muestreo fue el individuo, para cada uno de ellos se realizaron dos replicas, se registraron 50 nucleoides por réplica (100 por individuo) según lo propuesto por Collins (2004), luego se halló la media aritmética de los 100 datos para obtener un valor promedio por individuo. Posteriormente, se aplicó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar si los datos se ajustaban a la distribución normal y la prueba de Levene para identificar si existía homogeneidad de varianzas. Como los datos no se ajustaron a la distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para identificar la asociación entre las variables exposición y daño en el ADN genómico. Las medidas de resumen empleadas para reportar los datos fueron la mediana, como medida de tendencia central y el error estándar, como medida de dispersión.

Los datos relacionados con la edad y el tiempo de exposición fueron resumidos mediante la media aritmética. Luego se empleó la prueba t de Student para comparar el grupo expuesto con el grupo referente (no expuesto), de acuerdo con la edad. La información relacionada con el uso de equipos de protección respiratoria y el consumo de alcohol fue expresada en frecuencias absoluta y relativa, y se comprobó si existía diferencia entre los grupos de estudio de acuerdo con el consumo de alcohol mediante la prueba de Chi cuadrado.

Finalmente, se determinó la relación entre los parámetros de daño genómico (%TDNA y TM) y las variables cuantitativas tiempo de exposición y edad de los individuos expuestos, mediante la prueba de correlación de Spearman. También se calculó la relación entre los parámetros de daño genómico (%TDNA y TM) y la variable cualitativa consumo de alcohol de la muestra poblacional, a través de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Todo el procesamiento de datos y análisis estadístico se realizó con el software SPSS 11.5, además se utilizó un valor alfa de 0.05 y una potencia estadística del 80%.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La muestra poblacional estuvo integrada por 104 hombres sanos de la ciudad de Popayán, el grupo expuesto conformado por 52 pintores de carros expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos (SO), y el grupo referente (no expuesto), por 52 individuos. Las características demográficas de ambos grupos se muestran en la tabla 1, en ella se puede apreciar que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en el promedio de edad entre los dos grupos de estudio. Los pintores de carros estuvieron expuestos a solventes orgánicos por un tiempo promedio de 19 años con un rango entre 5 a 38 años, todos ellos manifestaron no usar traje, gafas y guantes protectores contra la exposición. Sin embargo, el 40.4% de los pintores utilizaban equipos de protección respiratoria (EPR), en este caso, máscaras para gases y vapores con filtros de carbón activo, aunque manifestaron no cambiar los filtros con regularidad.

En cuanto a factores relacionados con el estilo de vida, los individuos de la muestra poblacional presentaron características similares respecto al estrato socioeconómico y la dieta (datos no mostrados). Además, el 73.1% de los individuos del grupo referente (no expuesto), manifestaron ser consumidores no habituales de alcohol y el 26.9% no consumidores, las mismas cifras se pueden apreciar para el grupo expuesto, por lo tanto no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos grupos respecto al consumo de alcohol. Con relación al hábito de fumar, en este estudio se excluyeron a los individuos fumadores, debido a que esta variable es considerada como un posible factor de confusión en estudios de biomonitorio genético.

Tabla 1. Características demográficas de la población objeto de estudio, grupo referente (no expuesto) y grupo expuesto a solventes orgánicos

Características	Grupo referente (n = 52)	Grupo expuesto (n = 52)	p
Edad (años, promedio ± EE)	40.15 ± 1.24	39.54 ± 1.22	0.724 ^a
Tiempo de exposición (años, promedio ± EE)	-	19.10 ± 1.20	
Uso de equipos de protección respiratoria, n (%)			
No uso	-	31 (59.6)	
Uso	-	21 (40.4)	
Consumo de alcohol, n (%)			
No consumidores	14 (26.9)	14 (26.9)	
Consumidores	38 (73.1)	38 (73.1)	1.000 ^b

EE: Error Estándar; n: número total de individuos; (%): porcentaje por grupo.

a. Mediante la prueba t de Student.

b. Mediante la prueba de Chi cuadrado.

6.2 DAÑO GENÓMICO EN LEUCOCITOS POR EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A SOLVENTES ORGÁNICOS

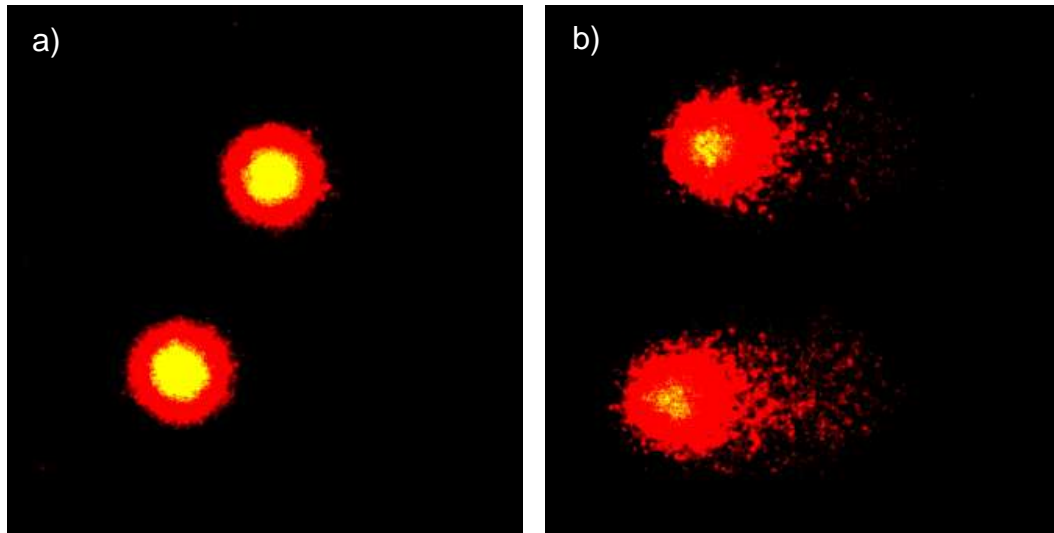
El daño en el ADN genómico fue cuantificado a través de los parámetros porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM). La tabla 2 muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el valor promedio de %TDNA y TM en leucocitos del grupo de pintores expuestos a solventes orgánicos y el valor promedio estimado para el grupo referente (no expuesto). Esta diferencia en el ADN genómico también se puede apreciar cualitativamente en la figura 3.

Tabla 2. Porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM) en leucocitos de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto a solventes orgánicos

Grupo	<i>n</i>	%TDNA	<i>p</i>	TM	<i>p</i>
Referente	52	7.29 ± 0.31		0.061 ± 0.004	
Expuesto	52	11.09 ± 0.65	<0.001 ^a	0.101 ± 0.011	<0.001 ^a

Los valores son expresados como mediana ± Error Estándar.
a. Mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 3. Imágenes de nucleoides, coloración con Bromuro de Etidio, microscopio de fluorescencia (400x)



a) Nucleoides de un individuo del grupo referente (no expuesto) con un daño basal en el ADN genómico; b) Nucleoides de un individuo del grupo expuesto con una mayor expresión del daño en el ADN genómico.

6.3 ASOCIACIÓN ENTRE EL DAÑO EN EL ADN GENÓMICO, LA EDAD, EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y EL CONSUMO DE ALCOHOL

Como lo muestra la tabla 3, no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$; correlación de Spearman) entre el daño en el ADN genómico, expresado como porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM), la edad y el tiempo de exposición a los solventes orgánicos.

Tabla 3. Asociación entre el daño en el ADN genómico, la edad y el tiempo de exposición, mediante la correlación de Spearman

Parámetro de daño en el ADN genómico	Edad	Tiempo de exposición
Porcentaje de ADN en la cola (%TDNA)	$r_s = -0.011$ $p = 0.913$ $n = 104$	$r_s = 0.120$ $p = 0.398$ $n = 52$
Momento de cola (TM)	$r_s = 0.031$ $p = 0.754$ $n = 104$	$r_s = 0.176$ $p = 0.213$ $n = 52$

r_s : coeficiente de correlación de Spearman; p : significancia estadística; n : número total de individuos.

Asimismo, como lo indica la tabla 4, el consumo de alcohol no está asociado significativamente ($p > 0.05$) con el daño en el ADN genómico (%TDNA y TM) de los individuos tanto del grupo referente (no expuesto) como del grupo expuesto. Luego, la edad, el tiempo de exposición a los solventes y el consumo de alcohol, son variables independientes que no influyen sobre la expresión del daño en el ADN genómico, por lo tanto, en este estudio el daño en el ADN está asociado principalmente con la exposición ocupacional a los solventes orgánicos.

Tabla 4. Porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM) en leucocitos de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto a solventes orgánicos, con relación al consumo de alcohol

Grupo	<i>n</i>	%TDNA	<i>p</i>	TM	<i>p</i>
Referente					
No consumidores	14	7.89±0.72		0.059±0.009	
Consumidores	38	7.27±0.33	0.398 ^a	0.061±0.004	0.757 ^a
Expuesto					
No consumidores	14	12.55±1.15		0.120±0.020	
Consumidores	38	11.00±0.78	0.621 ^a	0.094±0.013	0.529 ^a

Los valores son expresados como mediana ± Error Estándar.

a. Mediante la prueba U de Mann-Whitney.

7. DISCUSIÓN

En el municipio de Popayán (Cauca), se observó un gran número de individuos que laboran como pintores de carros, la mayoría de ellos pertenecen al sector informal de la economía, por lo tanto no están incluidos en un sistema de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional (VEO). Este estudio epidemiológico molecular tuvo como objetivo: “estimar el daño genómico en leucocitos de sangre periférica en una población expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos en la ciudad de Popayán”, el cual es concordante con la meta del Plan Nacional para la Prevención del Cáncer Ocupacional en Colombia, propuesto por el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Colombiano de Cancerología (2009), quienes manifiestan que la ausencia o deficiencia de indicadores biológicos (biomarcadores) de exposición o de efecto en trabajadores expuestos a agentes carcinógenos, es una de las limitaciones en la identificación de la presencia de factores de riesgo causal-ocupacional en el lugar de trabajo.

Algunos estudios de biomonitorio han empleado biomarcadores clásicos de efecto, como Alteraciones Cromosómicas, Intercambio de Cromátides Hermanas y Micronúcleos, para evaluar la exposición ocupacional a solventes orgánicos (SO) y pinturas (Gajalakshmi et al., 2002a; Gajalakshmi et al., 2002b; Hoyos-Giraldo et al., 2009; Pinto et al., 2000; Testa et al., 2005). Aunque las investigaciones mencionadas anteriormente brindan una valiosa información, puesto que asocian la exposición ocupacional a SO con daño genotóxico, se debe tener en cuenta que en los últimos años la exposición a agentes químicos en el lugar de trabajo ha disminuido (Sul et al., 2002). Por lo tanto, los nuevos estudios de biomonitorio en poblaciones expuestas a posibles compuestos cancerígenos, se deben enfocar en el empleo de biomarcadores de exposición como el ensayo cometa, puesto que esta técnica es más sensible que otras pruebas citogenéticas clásicas en la cuantificación del daño en el ADN de trabajadores expuestos a concentraciones

bajas de agentes genotóxicos (Kassie et al., 2000). Luego, en el presente estudio se empleó el daño en el ADN genómico identificado mediante el ensayo cometa, como biomarcador para evidenciar el riesgo para la salud, asociado con la exposición ocupacional a los solventes orgánicos en pintores de carros.

Recientemente, se ha desarrollado una versión optimizada del ensayo cometa, con el propósito de aumentar la eficiencia y validez de los resultados obtenidos con la prueba (McNamee et al., 2000; Ritter and Knebel, 2009; Stang and Witte, 2009). En este estudio, se empleó el ensayo cometa de alta eficiencia, el cual integra el uso de microplatos y de Gelbond (lámina de poliéster), para facilitar la manipulación y procesamiento de las muestras. Además, el uso del Gelbond mejora la adhesión de la agarosa de bajo punto de fusión en la que son inmersas las células, y disminuye el *background* de la fluorescencia con bromuro de etidio. Sin embargo, hasta el momento, los reportes que evalúan el daño genómico por la exposición a solventes orgánicos (SO) han utilizado el ensayo cometa convencional en portaobjetos de vidrio (Cassini et al., 2011; Heuser et al., 2007; Moro et al., 2012; Torres et al., 2008). Luego, en esta investigación, el ensayo cometa de alta eficiencia permitió estimar el daño en el ADN genómico de leucocitos de pintores de carros, y es la primera vez que se emplea esta metodología en el biomonitoreo genético de una población ocupacionalmente expuesta a SO.

Los leucocitos son células centinelas que circulan por todo el cuerpo, se encuentran en estado no proliferativo (fase G_0 del ciclo celular) y tienen un largo tiempo de vida media (hasta décadas), de manera que pueden acumular lesiones primarias en el ADN genómico por varios años, razón por la cual son muy usadas en el biomonitoreo genético (Dusinska and Collins, 2008; Fracasso et al., 2009). Asimismo, las lesiones primarias en el ADN de leucocitos por la exposición a un agente xenobiótico, reflejan la ocurrencia de daños similares en otro tipo de células blanco del organismo expuesto, de esta forma se pueden predecir los

riesgos de desarrollar problemáticas de salud, como el cáncer, por la exposición ocupacional a los solventes orgánicos. Por estas razones, en este estudio se emplearon leucocitos para evidenciar el daño en el ADN genómico de la población objeto de estudio. Además, se utilizaron leucocitos aislados porque se conoce que cuando se trabaja con sangre total, durante el desarrollo del ensayo cometa, específicamente en el proceso de lisis celular, los neutrófilos y eritrocitos aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el medio extracelular e incrementan los daños en el ADN de células adyacentes como los leucocitos (Narayanan et al., 2001). Por lo tanto, los resultados de este estudio son más confiables en comparación con otros que utilizan sangre total (Cassini et al., 2011; da Silva et al., 2012; Heuser et al., 2007; Moro et al., 2012), puesto que se disminuyó el sesgo asociado con el efecto originado por los neutrófilos y eritrocitos, y en consecuencia, se redujeron o eliminaron los posibles falsos positivos.

El daño en el ADN genómico determinado por el ensayo cometa puede ser cuantificado mediante diversos parámetros de medición, en los últimos años los más utilizados en estudios de biomonitorio son el porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y el momento de cola (TM) (Dusinska and Collins, 2008), los cuales se emplearon en este estudio. El momento de cola (producto de la longitud de la cola y el porcentaje de ADN en la cola) presenta algunos inconvenientes tales como no poseer unidades de medida estándar y variar de acuerdo con el sistema de análisis de imágenes que se utilice para su obtención y las condiciones de electroforesis de la prueba. En esta investigación, el empleo del ensayo cometa de alta eficiencia disminuyó la variación de los valores de la longitud de la cola, y por consiguiente del momento de cola, gracias a la reducción del número de electroforesis necesarias para estimar el daño en el ADN genómico de la muestra poblacional. Luego, el uso de la versión optimizada del ensayo cometa, permitió superar los problemas asociados con este parámetro de medición en la metodología convencional (en portaobjetos de vidrio).

Según la información obtenida en las encuestas, los pintores de carros están expuestos con mayor frecuencia a una mezcla compleja de solventes orgánicos, conocida como *thinner* 0.14. Es difícil establecer la composición de este producto con base en las etiquetas de su presentación comercial, pero mediante un análisis de cromatografía de gases PIANO, se determinó que el *thinner* 0.14 contiene principalmente tolueno, isobutano, xileno, hexano, nonano, 2,3-dimetilhexano, etilbenceno y octano (Hoyos-Giraldo et al., 2009). Aunque estos compuestos por sí solos, no son considerados como cancerígenos (IARC, 1999, 2000), la mezcla de ellos puede potenciar sus efectos e incrementar el estrés oxidativo, el daño en el ADN y por lo tanto el riesgo de cáncer (Cassini et al., 2011; Martínez-Alfaro et al., 2010; Moro et al., 2012).

Los resultados de este estudio muestran un incremento estadísticamente significativo de los valores de porcentaje de ADN en la cola (%TDNA) y momento de cola (TM) del grupo de pintores, en comparación con los valores del grupo referente (no expuesto), lo cual evidencia que la exposición ocupacional a los solventes orgánicos (SO) induce daño en el ADN genómico de leucocitos de sangre periférica. Estos resultados son concordantes con otras investigaciones que reportan un incremento significativo del daño en el ADN genómico de pintores de carros mediante el empleo del ensayo cometa (Cassini et al., 2011; da Silva et al., 2012; Martino-Roth et al., 2003; Moro et al., 2012). En contraste, otros estudios muestran que no existe asociación entre el daño en el ADN genómico y la exposición ocupacional a SO en una fábrica de calzado (Pitarque et al., 1999) y en una fábrica de pinturas (Cárdenas-Bustamante et al., 2007), posiblemente porque trabajan con un tamaño muestral menor al del presente estudio (34 expuestos/ 19 referentes y 33 expuestos/ 28 referentes, respectivamente), además emplean la metodología convencional del ensayo cometa, incluyen individuos fumadores en la muestra poblacional y los individuos expuestos tienen diferentes ocupaciones, lo cual puede cambiar la concentración de los SO en el lugar de trabajo. Asimismo, hay que tener en cuenta que la diferencia en los resultados puede estar asociada

con la influencia de la susceptibilidad individual, específicamente por polimorfismos en genes del metabolismo de los solventes orgánicos en la población objeto de estudio. En el presente estudio, también se observó que el valor de la mediana del %TDNA (7.29 ± 0.31) en el grupo referente (no expuesto), el cual expresa el daño basal de la muestra poblacional, está dentro del rango (4.4 - 14.5) de los valores de referencia del %TDNA determinados por el ensayo cometa en el ADN genómico de leucocitos, propuesto por Moller (2006) en un artículo de revisión que integra la información de 125 estudios de biomonitorio, con un tamaño poblacional de 4998 individuos, por lo tanto los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa de alta eficiencia son confiables.

El incremento del daño en el ADN observado en el grupo expuesto a solventes orgánicos (SO), está asociado con el metabolismo de compuestos como el tolueno (principal componente del *thinner* 0.14), el cual puede oxidarse y formar orto-, meta- y para-cresoles, que son hidroxilados y transformados a metilhidroquinona y metilbenzoquinona, moléculas que mediante procesos de oxido-reducción generan especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden causar estrés oxidativo y conllevar al daño oxidativo en diferentes biomoléculas (Murata et al., 1999). Además, la oxidación del para-cresol forma un metiluro de quinona que puede inducir daño en el ADN por alquilación directa (Gaikwad and Bodell, 2003). Un proceso similar ocurre en el metabolismo del etilbenceno (otro componente del *thinner* 0.14), puesto que la oxidación del anillo aromático de esta molécula puede producir 2-etilfenol y 4-etilfenol, éstos compuestos son hidroxilados dando origen a etilhidroquinona y 4-etilcatecol respectivamente, los cuales son causantes de daño oxidativo en el ADN debido al incremento de EROs (IARC, 2000; Midorikawa et al., 2004). Las EROs, especialmente el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), reacciona con las purinas y pirimidinas del ADN por adición a enlaces dobles, además puede abstraer un radical hidrógeno ($\text{H}\cdot$) del grupo metilo de la timina y de cada uno de los enlaces carbono-hidrógeno (C-H) de la 2'-desoxirribosa. A través de estas reacciones se generan roturas de cadena sencilla y doble, y sitios apurínicos y

apirimidínicos (AP) en el ADN (Dizdaroglu, 2012; Evans et al., 2004). Los sitios AP son lábiles al álcali, por lo tanto en el proceso de desnaturalización del ensayo cometa, realizado a un pH > 13, se inducen roturas de cadena sencilla en el ADN a partir de éstos. Luego, este estudio permitió estimar el incremento en las roturas de cadena sencilla y doble en el ADN genómico de leucocitos, asociado con la exposición a los SO.

Algunos factores demográficos y el estilo de vida de las personas pueden influenciar el nivel basal de daño en el ADN genómico, por lo tanto, estudios de biomonitorio humano que utilicen como biomarcador el ensayo cometa deben analizar el efecto de posibles variables de confusión como la edad, el tiempo de exposición, el consumo de alcohol y el hábito de fumar sobre el daño basal en el ADN genómico, y así evitar resultados erróneos o malinterpretados (Dusinska and Collins, 2008). Con relación a la edad, Moller (2006) reporta que esta variable influye sobre el daño basal en el ADN genómico de forma directamente proporcional, es decir que el daño en el ADN aumenta con el incremento de la edad, debido a que el envejecimiento causa el deterioro y el mal funcionamiento de procesos biológicos como el metabolismo de los xenobióticos y la reparación del ADN, lo cual ha sido corroborado por Mdalinic y colaboradores (2010). Contrario a lo anterior, en el presente estudio no se encontró una correlación entre los parámetros de daño en el ADN genómico y esta variable, posiblemente porque los individuos del grupo expuesto fueron emparejados por edad (± 2 años), con los individuos del grupo referente (no expuesto). Este tipo de muestreo se realizó con el propósito de eliminar las diferencias del daño en el ADN genómico por la influencia de la edad entre los grupos de estudio, de manera que los resultados de la investigación expresaran específicamente el efecto de la exposición ocupacional a los solventes orgánicos. Además, en la revisión de Moller (2006) se evidencia un mayor rango de edad (0 - 90 años) de la muestra poblacional, en comparación con el rango de edad (18 - 50 años) de la muestra poblacional del presente estudio, lo cual también podría influenciar en la correlación entre el daño en el ADN genómico

y la edad. Otros estudios de biomonitorio genético en individuos ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos, tampoco muestran asociación entre estas variables (Fracasso et al., 2009; Roma-Torres et al., 2006; Sul et al., 2002). No obstante, también existen reportes que concuerdan con la revisión de Moller (2006) (Cassini et al., 2011; Moro et al., 2012).

La influencia del tiempo de exposición sobre el daño en el ADN genómico, determinado por el ensayo cometa ha sido poco estudiada. Georgieva y colaboradores (2008) afirman que la exposición prolongada a una dosis anual de radiación inferior a dos veces la dosis normal en una central nuclear, disminuye el daño en el ADN e incrementa su tasa de reparación, puesto que la célula aumenta la resistencia al agente genotóxico y reduce, de manera paulatina, los niveles de estrés oxidativo. Puede ser que una situación similar ocurra en individuos expuestos de forma crónica a bajas concentraciones de agentes químicos, sin embargo, en esta investigación no se encontró una asociación significativa entre el daño en el ADN genómico determinado por el ensayo cometa y el tiempo de exposición a los solventes orgánicos (SO), probablemente porque el número de pintores expuestos fue insuficiente para evaluar el efecto del tiempo de exposición sobre el daño en el ADN (Albertini et al., 2000). De igual forma, otros estudios de biomonitorio genético no encuentran esta relación (Sardas et al., 2010; Zhu et al., 2001). En contraste, una investigación reporta una correlación entre el daño en el ADN genómico y un tiempo de exposición a SO mayor a 19 años (Roma-Torres et al., 2006), ésta difiere del presente estudio en el tipo de exposición ocupacional, puesto que es un biomonitorio en trabajadores de una refinera de petróleo, donde los individuos están expuestos a diferentes hidrocarburos, entre ellos el benceno, el cual es considerado, por sí sólo, como un potencial agente carcinógeno para el ser humano (IARC, 1982).

Algunos estudios asocian el consumo crónico de bebidas alcohólicas con un aumento de lesiones en el ADN, específicamente bases oxidadas y roturas de

cadena sencilla, las cuales son generadas durante el metabolismo del etanol, a través de la producción de especies reactivas de oxígeno como el radical libre hidroxietilo (Weng et al., 2010; Yan et al., 2011). Sin embargo en este estudio no se encontró una relación significativa entre el daño en el ADN genómico determinado por el ensayo cometa y esta variable de confusión, tanto en el grupo expuesto como el referente (no expuesto), posiblemente por la frecuencia irregular en la ingesta de alcohol de los individuos de la muestra poblacional (pocas veces al mes o al año), además porque no hubo diferencia significativa entre el grupo expuesto a solventes orgánicos y el grupo referente (no expuesto), respecto al consumo de alcohol. Este resultado es concordante con los reportados en otros estudios de biomonitorio en individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos (Lam et al., 2002; Moro et al., 2012; Zhu et al., 2001).

Con relación al hábito de fumar, se conoce que el humo de cigarrillo contiene una variedad de carcinógenos, cocarcinógenos, mutágenos y promotores tumorales, los cuales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, causando daños oxidativos o alquilantes (Vadhanam et al., 2012). Sin embargo, el efecto de fumar sobre el daño en el ADN genómico detectado a través del ensayo cometa aún no es claro. Moller (2006) y Speit y colaboradores (2003) afirman que el hábito de fumar no es un factor determinante de la genotoxicidad detectada por la prueba del cometa, aunque algunos autores reportan que el daño oxidativo es significativamente mayor en fumadores respecto a no fumadores (Dušinská et al., 2001; Fracasso et al., 2006). En algunos estudios de biomonitorio se muestra un efecto sinérgico entre la exposición ocupacional a solventes orgánicos y la exposición a los componentes del humo de cigarrillo (Lam et al., 2002; Sardas et al., 2010; Zhu et al., 2001). No obstante, también existen reportes de investigaciones con grupos pequeños de fumadores y no fumadores que no encuentran diferencia entre ambos, respecto al daño genómico (Fracasso et al., 2009; Moro et al., 2012; Roma-Torres et al., 2006). Por lo anterior, es evidente que el hábito de fumar es un potencial factor de confusión en estudios de biomonitorio

que utilicen el ensayo cometa para detectar daño en el ADN genómico. Luego, para controlar esta variable y por el conocimiento que se tiene sobre los efectos cancerígenos de los componentes del humo de cigarrillo, en el presente estudio se excluyeron fumadores y ex fumadores de la muestra poblacional, de manera que los resultados observados expresaran específicamente la relación entre la exposición ocupacional a los solventes orgánicos y el daño en el ADN. Con relación al uso de equipos de protección respiratoria, no se realizó la asociación entre el daño en el ADN genómico y esta variable debido a que la mayoría de pintores no utilizaban correctamente las máscaras para gases y vapores con filtros de carbón activo, por lo tanto los datos obtenidos no serían concluyentes.

La estimación del daño en el ADN genómico de leucocitos de individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos (SO), permite inferir la ocurrencia de lesiones similares en otras células de los individuos expuestos a estos compuestos químicos. Si estas lesiones son mal reparadas o no reparadas en las células proliferativas, pueden expresarse como mutaciones, las cuales son consideradas como eventos iniciales en el desarrollo de enfermedades asociadas con la inestabilidad genómica, como el cáncer (Dizdaroglu, 2005). Luego, el propósito de este estudio epidemiológico molecular en una población expuesta a SO, es alertar y motivar a las instituciones gubernamentales que controlan la salud de los trabajadores, hacia el diseño y ejecución de políticas y estrategias de promoción de la salud e intervención temprana, que eliminen o reduzcan la exposición ocupacional a agentes potencialmente cancerígenos, como los solventes orgánicos.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que la exposición a solventes orgánicos induce daño en el ADN genómico de leucocitos de sangre periférica en pintores de carros de la ciudad de Popayán, por lo tanto, estos individuos son una población en riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con la inestabilidad genómica, como el cáncer.

No se encontró asociación entre el daño en el ADN genómico de leucocitos de sangre periférica en pintores de carros expuestos a solventes orgánicos, estimado mediante el ensayo cometa de alta eficiencia, y las variables de confusión edad, tiempo de exposición y consumo de alcohol.

El daño en el ADN genómico determinado mediante el ensayo cometa de alta eficiencia es un biomarcador de exposición útil en la identificación de poblaciones en riesgo de desarrollar problemas de salud por la exposición ocupacional a agentes químicos como los solventes orgánicos, por lo tanto puede ser utilizado como una herramienta en programas de vigilancia epidemiológica ocupacional (VEO), en trabajadores tanto del sector formal como del sector informal.

9. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

9.1 A NIVEL SOCIAL

Los resultados del presente estudio fueron presentados a los individuos objeto de estudio, a través del curso taller “Autocuidado en el trabajo, por una mejor salud”, en el cual se dieron a conocer los riesgos a la salud asociados con la exposición a los solventes orgánicos, entre ellos el riesgo de desarrollar enfermedades complejas como el cáncer. Lo anterior, con el fin de crear conciencia sobre la importancia de usar equipos de protección personal (EPPs) para minimizar la exposición a los compuestos químicos. Asimismo, mediante la publicación de los resultados, esta investigación brindará información útil a las instituciones gubernamentales para que desarrollen políticas de seguridad pública en torno a la salud ocupacional, y se genere una cultura de promoción de la salud y prevención temprana de enfermedades relacionadas con la exposición a agentes xenobióticos, mutagénicos y/o cancerígenos en el lugar de trabajo.

9.2 A NIVEL CIENTÍFICO

Mediante la publicación del respectivo artículo científico en una revista indexada, este estudio brindará un conocimiento sobre el daño en el ADN genómico causado por exposición ocupacional a solventes orgánicos, lo que motivará el diseño y desarrollo de nuevas investigaciones en poblaciones similares. Además, se espera aportar al proyecto internacional ComNet, el cual busca la validación del ensayo cometa como un biomarcador de confianza en el biomonitoreo genético humano.

10. RECOMENDACIONES

Estudios de biomonitoreo genético en poblaciones expuestas ocupacionalmente a posibles agentes genotóxicos, que utilicen el biomarcador citogenético molecular, daño en el ADN genómico determinado mediante el ensayo cometa de alta eficiencia, brindarían una mayor información si se complementan con el empleo de otros biomarcadores y metodologías, por ejemplo:

Monitoreo Ambiental: sería pertinente determinar de manera específica la concentración de los compuestos químicos a los que están expuestos los individuos en el lugar de trabajo.

Biomarcadores de exposición en sangre y orina: sería conveniente estimar la concentración de los xenobióticos en la sangre y de sus productos metabólicos en la orina, para determinar el nivel de absorción y el metabolismo de estos compuestos químicos en el organismo.

Empleo del ensayo cometa con enzimas glicosilasas: sería pertinente integrar al ensayo cometa de alta eficiencia, el empleo de enzimas glicosilasas que reconozcan bases oxidadas (Endo III y FpG), y bases alquiladas (AlkA), para identificar el tipo específico de daño que inducen los compuestos químicos.

Biomarcadores de susceptibilidad: sería conveniente identificar genotipos polimórficos de genes del metabolismo de los xenobióticos en la muestra poblacional, para determinar subgrupos susceptibles de expresar un mayor o menor daño en el ADN genómico por la exposición ocupacional a estos compuestos químicos.

BIBLIOGRAFÍA

Aksoy, H., Yilmaz, S., Celik, M., Yuzbasioglu, D., and Unal, F. (2006). Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. *J Appl Toxicol* 26, 10-15.

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., *et al.* (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 111-172.

Alguacil, J., Porta, M., Malats, N., Kauppinen, T., Kogevinas, M., Benavides, F.G., Partanen, T., Carrato, A., and Grp, P.I.S. (2002). Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 23, 101-106.

Andreoli, C., Leopardi, P., and Crebelli, R. (1997). Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 377, 95-104.

Bonassi, S., and Au, W.W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511, 73-86.

Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., *et al.* (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 627, 31-35.

Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J.-L. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531, 5-23.

Cárdenas-Bustamante, O., Varona-Uribe, M., Patiño-Florez, R.I., Groot-Restrepo, H., Sicard-Suárez, D., Tórres-Carvajal, M.M., and Pardo-Pardo, D. (2007). Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá. *Revista de Salud Pública* 9, 275-288.

Cassini, C., Calloni, C., Bortolini, G., Garcia, S.C., Dornelles, M.A., Henriques, J.A.P., Erdtmann, B., and Salvador, M. (2011). Occupational risk assessment of oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 24, 308-319.

Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.

Collins, A.R., and Dušinská, M. (2002). Oxidation of Cellular DNA Measured with the Comet Assay. *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols*. In, D. Armstrong, ed. (Humana Press), pp. 147-159.

Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., and Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.

da Silva, V.H.P., de Moura, C.F.G., Spadari-Bratfisch, R.C., and Ribeiro, D.A. (2012). Cytogenetic biomonitoring of peripheral blood and oral mucosa cells from car painters. *Toxicol Mech Methods* 22, 497-501.

DANE (2013). Medición del Empleo Informal y Seguridad Social. Trimestre móvil septiembre - noviembre 2012. In *Resumen Ejecutivo* (Bogotá, D.C. Colombia, Departamento Administrativo Nacional de Estadística).

De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Vande, P.A., and Kirsch-Volders, M. (2000). Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 469, 181-197.

Dizdaroglu, M. (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 591, 45-59.

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters* 327, 26-47.

Dusinska, M. (2000). The Comet Assay modified for detection of oxidised bases with the use of bacterial repair endonucleases (Bratislava, Slovakia, Institute of Preventive and Clinical Medicine).

Dusinska, M., and Collins, A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23, 191-205.

Dušinská, M., Ficek, A., Horská, A., Rašlová, K.n., Petrovská, H., Vallová, B., Drlicková, M., Wood, S.G., Štupáková, A., Gašparovič, J., *et al.* (2001). Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 482, 47-55.

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567, 1-61.

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., and O'Neill, K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339, 37-59.

Fonseca Patiño, P.A., Heredia Villarroya, J.A., and Navarrete Tarquino, D.M. (2011). Vigilancia médica para los trabajadores expuestos a benceno, tolueno y xileno (Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario).

Fracasso, M.E., Doria, D., Bartolucci, G.B., Carrieri, M., Lovreglio, P., Ballini, A., Soleo, L., Tranfo, G., and Manno, M. (2010). Low air levels of benzene: Correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicology Letters* 192, 22-28.

Fracasso, M.E., Doria, D., Carrieri, M., Bartolucci, G.B., Quintavalle, S., and De Rosa, E. (2009). DNA single- and double-strand breaks by alkaline- and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Toxicology Letters* 185, 9-15.

Fracasso, M.E., Doria, D., Franceschetti, P., Perbellini, L., and Romeo, L. (2006). DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicology Letters* 167, 131-141.

Gaikwad, N.W., and Bodell, W.J. (2003). Formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with the toluene metabolite p-cresol: a potential biomarker for toluene exposure. *Chemico-Biological Interactions* 145, 149-158.

Gajalakshmi, P., Balasundaram, A., Venkatesan, P., Santhiya, S.T., and Ramesh, A. (2002a). Cytogenetic studies on spray painters in south India. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 514, 1-6.

Gajalakshmi, P., Mallick, P., Venkatesan, P., Santhiya, S.T., and Ramesh, A. (2002b). Studies on Sister Chromatid Exchanges in Peripheral Lymphocytes of Spray Painters. 21, 3.

Georgieva, R.T., Zaharieva, E.K., Rupova, I.M., Acheva, A.R., and Nikolov, V.N. (2008). DNA damage and repair in white blood cells at occupational exposure. *Journal of Physics: Conference Series* 101, 012019.

Goud, K.I., Shankarappa, K., Vijayashree, B., Rao, K.P., and Ahuja, Y. (2001). DNA damage and repair studies in individuals working with photocopying machines. *International Journal of Human Genetics* 1, 139-143.

He, Z., and Yu, W. (2010). Stable feature selection for biomarker discovery. *Computational Biology and Chemistry* 34, 215-225.

Heuser, V.D., Andrade, V.M.d., da Silva, J., and Erdtmann, B. (2005). Comparison of genetic damage in brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 583, 85-94.

Heuser, V.D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., and da Silva, J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232, 235-247.

Hoyos-Giraldo, L.S., Carvajal, S., Cajas-Salazar, N., Ruíz, M., and Sánchez-Gómez, A. (2009). Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 666, 8-15.

IARC (1982). Some Industrial Chemicals and Dyestuffs. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Lyon, France, International Agency for Research on Cancer), pp. 416.

IARC (1989). Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Lyon, France, International Agency for Research on Cancer), pp. 535.

IARC (1999). Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Lyon, France, International Agency for Research of Cancer), pp. 1586.

IARC (2000). Some Industrial Chemicals. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Lyon, France, International Agency for Research of Cancer), pp. 563.

IARC (2010). Painting, Firefighting, and Shiftwork: Occupational Exposure as a Painter. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Lyon, France, International Agency for Research on Cancer), pp. 804.

IARC (2012). Chemical Agents and Related Occupations (A review of Human Carcinogens). In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Lyon, France, International Agency for Research on Cancer), pp. 599.

Kassie, F., Parzefall, W., and Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 13-31.

Kirsch-Volders, M., Mateuca, R.A., Roelants, M., Tremp, A., Zeiger, E., Bonassi, S., Holland, N., Chang, W.P., Aka, P.V., DeBoeck, M., *et al.* (2006). The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1038-1042.

Lam, T.H., Zhu, C.Q., and Jiang, C.Q. (2002). Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 515, 147-157.

Lee, J., Koo, N., and Min, D. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 21-33.

Lof, A., and Johanson, G. (1998). Toxicokinetics of organic solvents: A review of modifying factors. *Critical Reviews in Toxicology* 28, 571-571.

Lynge, E., Anttila, A., and Hemminki, K. (1997). Organic solvents and cancer. *Cancer Causes and Control* 8, 406-419.

Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., and Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters* 192, 3-16.

Martinez-Alfaro, M., Carabez-Trejo, A., Gallegos-Corona, M.A., Pedraza-Aboytes, G., Hernandez-Chan, N.G., and Leo-Amador, G.E. (2010). Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *J Appl Toxicol* 30, 226-232.

Martino-Roth, M., Viegas, J., and Roth, D. (2003). Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res* 2, 410-417.

Mastaloudis, A., Yu, T.W., O'Donnell, R.P., Frei, B., Dashwood, R.H., and Traber, M.G. (2004). Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radical Biology and Medicine* 36, 966-975.

McNamee, J.P., McLean, J.R.N., Ferrarotto, C.L., and Bellier, P.V. (2000). Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 466, 63-69.

Midorikawa, K., Uchida, T., Okamoto, Y., Toda, C., Sakai, Y., Ueda, K., Hiraku, Y., Murata, M., Kawanishi, S., and Kojima, N. (2004). Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage. *Chemico-Biological Interactions* 150, 271-281.

Ministerio de la Protección Social, and Instituto Nacional de Cancerología (2009). Plan Nacional para la Prevención del Cáncer Ocupacional en Colombia (Bogotá, D.C. Colombia, Ministerio de la Protección Social), pp. 41.

Ministerio de Salud (1993). Resolución Número 8430 de 1993. In Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (Bogotá, D.C. Colombia, Ministerio de Salud).

Mladinic, M., Kopjar, N., Milic, M., Dasovic, A.B., Huzak, M., and Zeljezic, D. (2010). Genomic instability in a healthy elderly population: a pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing. *Mutagenesis* 25, 455-462.

Møller, P. (2006). Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 612, 84-104.

Moro, A.M., Brucker, N., Charão, M., Bulcão, R., Freitas, F., Baierle, M., Nascimento, S., Valentini, J., Cassini, C., Salvador, M., *et al.* (2012). Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.

Murata, M., Tsujikawa, M., and Kawanishi, S. (1999). Oxidative DNA Damage by Minor Metabolites of Toluene May Lead to Carcinogenesis and Reproductive Dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications* 261, 478-483.

Narayanan, S., O'Donovan, M.R., and Duthie, S.J. (2001). Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes. *Mutagenesis* 16, 455-459.

Needham, L.L., Calafat, A.M., and Barr, D.B. (2007). Uses and issues of biomonitoring. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210, 229-238.

Norbury, C.J., and Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 367-401.

Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.

E., d ¼ ÈòI=ε κ=d ~êÅσ^~I=^ κ=~â Ç=d çãëÄ~íIj κ K=EOMMMF K=fâ ÅêÉ~ëÉÇ= cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 467, 105-111.

Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., and Marcos, R. (1999). Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 441, 115-127.

Rêgo, M.A.V., Sousa, C.S.C., Kato, M., de Carvalho, A.B., Loomis, D., and Carvalho, F.M. (2002). Non-Hodgkin's lymphomas and organic solvents. *J Occup Environ Med* 44, 874-881.

Ritter, D., and Knebel, J. (2009). Genotoxicity testing in vitro - Development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro* 23, 1570-1575.

Rojas, E., Lopez, M.C., and Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722, 225-254.

Roma-Torres, J., Teixeira, J.P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L.M., Méndez, J., and Mayan, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a

petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 604, 19-27.

Rutchik, J.S. (2012). Organic Solvents. In *Medscape Reference: Drugs, Diseases & Procedures*, T.S. Ramachandran, ed. (Medscape Reference).

Sardas, S., Omurtag, G.Z., Tozan, A., Gül, H., and Beyoglu, D. (2010). Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solvent-based paints in Turkey. *Toxicology and Industrial Health* 26, 601-608.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.

Speit, G., Witton-Davies, T., Heepchantree, W., Trenz, K., and Hoffmann, H. (2003). Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 542, 33-42.

Stang, A., and Witte, I. (2009). Performance of the comet assay in a high-throughput version. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 675, 5-10.

Sul, D., Lee, D., Im, H., Oh, E., Kim, J., and Lee, E. (2002). Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicology Letters* 134, 87-95.

Testa, A., Festa, F., Ranaldi, R., Giachelia, M., Tirindelli, D., De Marco, A., Owczarek, M., Guidotti, M., and Cozzi, R. (2005). A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 46, 182-188.

Torres, C.H., Varona, M.E., Lancheros, A., Patiño, R.I., and Groot, H. (2008). Evaluación del daño en el ADN y vigilancia biológica de la exposición laboral a solventes orgánicos, 2006. *Biomédica* 28, 126-138.

Vadhanam, M.V., Thaiparambil, J., Gairola, C.G., and Gupta, R.C. (2012). Oxidative DNA Adducts Detected in Vitro from Redox Activity of Cigarette Smoke Constituents. *Chemical Research in Toxicology* 25, 2499-2504.

Valentine, J.L., Lee, S.S.T., Seaton, M.J., Asgharian, B., Farris, G., Corton, J.C., Gonzalez, F.J., and Medinsky, M.A. (1996). Reduction of Benzene Metabolism and Toxicity in Mice That Lack CYP2E1 Expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141, 205-213.

Valverde, M., and Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681, 93-109.

Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., and Guidotti, M. (2006). Exposure to organic solvents among handicraft car painters: A pilot study in Italy. *Ind Health* 44, 310-317.

Wallace, S.S., Murphy, D.L., and Sweasy, J.B. (2012). Base excision repair and cancer. *Cancer Letters* 327, 73-89.

Weng, H., Weng, Z., Lu, Y., Nakayama, K., and Morimoto, K. (2010). Effects of alcohol-drinking behaviour and ADH1B and ALDH2 polymorphisms on basal DNA damage in human mononuclear cells as determined by the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 701, 132-136.

World Medical Association (2008). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects (World Medical Association).

Yan, Y., Yang, J.Y., Mou, Y.H., Wang, L.H., Zhang, H., and Wu, C.F. (2011). Possible Metabolic Pathways of Ethanol Responsible for Oxidative DNA Damage in Human Peripheral Lymphocytes. *Alcoholism* 35, 1-9.

Zhu, C.Q., Lam, T.H., and Jiang, C.Q. (2001). Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491, 173-181.