

**IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL HUMO DE
SOLDADURA EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE,
MEDIANTE EL ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL
EPITELIO BUCAL.**

ANGELA LARA MONTERO

**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**

**IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL HUMO DE
SOLDADURA EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE,
MEDIANTE EL ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL
EPITELIO BUCAL.**

ANGELA LARA MONTERO

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

LUZ STELLA HOYOS GIRALDO PhD.

Directora

SILVIO CARVAJAL VARONA Mg.

Asesor

**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:

Luz Stella Hoyos Giraldo PhD.
Director

Elizabeth Londoño Mg.
Jurado

Diana Muñoz Mg.
Jurado

Popayán, 28 de Octubre del 2013

A Dios, por darme fortaleza y guiarme siempre durante todos los momentos de mi vida...

A mis padres, por estar siempre para mí brindándome su todo su amor y su apoyo

A mis hermanos y familiares por cada palabra de motivación para seguir adelante.

A mis amigos y todos por estar presentes respaldándome con cariño en la culminación de esta nueva etapa.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todos los soldadores, que participaron en este estudio, ya que sin ellos no se hubiera realizado.

A mis padres por estar siempre a mi lado, brindándome todo su amor y apoyo.

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

Al MG. Silvio Carvajal, por su valiosa colaboración y asesoría para el desarrollo de este trabajo.

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

Un agradecimiento especial a las personas que han sido muy importantes en mi vida que siempre han estado a mi lado compartiendo mis alegrías y me han apoyado en los momentos difíciles, a mi familia y mis amigos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. MARCO REFERENCIAL	18
3.1 HUMO DE SOLDADURA	18
3.2 METALES PESADOS	19
3.3 DAÑO GENÓMICO: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LESIÓN PRIMARIA DEL ADN	23
3.4 BIOMONITOREO Y BIOMARCADORES	24
3.5 ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL...24	
3.5.2 Anomalías nucleares de células indicadoras de efecto genotóxico	26
3.5.3 Validación de la prueba de Micronúcleos (MN) en Linfocitos de sangre periférica y del ensayo citómico en células exfoliadas como predictor de riesgo de cáncer	26
3.6 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS MOLECULARES Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES	27
4. ANTECEDENTES	28
5. OBJETIVOS	31
5.1 OBJETIVO GENERAL	31
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
6. MARCO METODOLÓGICO	31
6.1 TIPO DE ESTUDIO	32
6.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	32
6.3 HIPOTESIS	32
6.4 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO	32
6.5 SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	33
6.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS	34
6.5 ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL...34	

6.5.1 Toma de la muestra de células bucales de ambas mejillas	34
6.5.2 Aislamiento de células bucales, obtención de las preparaciones citogenéticas y coloración.....	34
6.5.3 Registro de anomalías nucleares indicadoras de efecto citotóxico	35
6.5.4 Registro de anomalías nucleares indicadoras de efecto genotóxico	35
6.6 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
7. RESULTADOS.....	37
7.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	37
7.2 EFECTO CITOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL AL HUMO DE SOLDADURA.....	38
7.3 EFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL AL HUMO DE SOLDADURA.....	39
7.4 ASOCIACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES DEL ENSAYO CITOMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL, EN LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.....	40
7.5 ASOCIACIÓN DE LA EDAD, EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y EL CONSUMO DE ALCOHOL CON EL EFECTO CITOTÓXICO.....	41
7.6 ASOCIACIÓN ENTRE EL EFECTO GENOTÓXICO, LA EDAD, EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y EL CONSUMO DE ALCOHOL	43
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	59
10. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS	60
11. RECOMENDACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS.....	71

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Contaminantes procedentes del metal base de las piezas.....	19
Tabla 2. Contaminantes procedentes del recubrimiento de las piezas.....	19
Tabla 3. Contaminantes procedentes de los materiales de aporte.....	20
Tabla 4. Clasificación de las variables de estudio.....	33
Tabla 5. Características demográficas de la población objeto de estudio, grupo referente (no expuesto) y grupo expuesto a humo soldadura.....	38
Tabla 6. Valores promedio de la frecuencia de las células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (PC), células carioréticas (CR) y células cariolíticas (CL), en células exfoliadas del epitelio bucal de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto al humo de soldadura.....	39
Tabla 7. Valores promedio de la frecuencia de células con micronúcleos (MN), células con brotes nucleares (BE) y células binucleadas (BN), en células exfoliadas del epitelio bucal de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto al humo de soldadura.....	40
Tabla 8. Correlación entre los biomarcadores del ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal, para la población objeto de estudio.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Límites de exposición profesional de algunos humos metálicos de soldadura.....	20
Figura 2. Ubicación espacial de los estratos y las células del epitelio bucal.....	25
Figura 3. Células exfoliadas del epitelio bucal con anomalías nucleares indicadoras de daño citotóxico. Tinción de Feulgen Fast-green (1000X).....	39
Figura 4. Células exfoliadas del epitelio bucal con anomalías nucleares indicadoras de daño genotóxico. Tinción de Feulgen Fast-green (1000X).....	40
Figura 5. Asociación entre la frecuencia de células con cromatina condensada, células carioréticas, células cariolíticas con el tiempo de exposición.....	42
Figura 6. Asociación entre la frecuencia de células picnóticas con el tiempo de exposición.....	43
Figura 7. Asociación entre la frecuencia de células con brotes nucleares y la edad.....	44

RESUMEN

Introducción: Según la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC), la exposición ocupacional al humo de soldadura es considerada como posible carcinógeno para los humanos. El humo de soldadura es una mezcla de gases y metales de los cuales poco se conocen sobre efectos genotóxicos por su exposición. **Objetivo:** Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del humo de soldadura en personas expuestas ocupacionalmente, mediante el ensayo Citómico en células exfoliadas del epitelio bucal. **Metodología:** Se realizó un frotis con un cepillo citológico en la parte interna de las mejillas de individuos expuestos ($n = 55$) y referentes (no expuestos) ($n = 55$). Se evaluó el efecto citotóxico en células exfoliadas del epitelio bucal mediante la frecuencia de células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (PC), células carioréticas (CR), células cariolíticas (CL) y células binucleadas (BN); y el efecto genotóxico a través de la frecuencia de micronúcleos (MN) y brotes nucleares (BE) mediante el ensayo citómico. **Resultados:** se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$; prueba U de Mann-Whitney) entre el promedio de las frecuencias de anomalías indicadores de muerte celular (CC, PC, CR y CL) del grupo expuesto con respecto al grupo referente (no expuesto). Para las anomalías nucleares de efecto genotóxico se observó un incremento pero este no fue estadísticamente significativo. ($p > 0.05$). **Discusión:** el incremento en los biomarcadores de muerte celular en el grupo expuesto al humo de soldadura está asociado con la inducción de efectos citotóxicos por parte de especies reactivas de oxígeno y metales pesados o a su vez producen daños en el ADN que no son reparados o son mal reparados y las células eliminan este exceso de daño por la vía de la muerte celular. **Conclusión:** la exposición al humo de soldadura induce efectos citotóxicos en células exfoliadas del epitelio bucal de soldadores de la ciudad de Popayán, por tal razón los soldadores son una población con riesgo a desarrollar enfermedades de origen ocupacional, por lo tanto requieren mayor atención por parte de las entidades gubernamentales relacionadas con la promoción de salud.

Palabras clave: Humo de soldadura, daño citotóxico, daño genotóxico, ensayo citómico, anomalías nucleares.

INTRODUCCIÓN

La Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC 1990) considera el humo de soldadura como un posible carcinógeno (grupo 2B), debido a que no existe suficiente información que relacione la exposición al humo de soldadura con efectos cancerígenos tanto en animales como en humanos. Los soldadores durante el proceso de soldar están expuestos a una mezcla compleja de gases (monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxido de nitrógeno y ozono) y metales particulados (hierro, cadmio, cobre, cromo, aluminio, zinc, estaño y níquel) (Sriram et al. 2011). El humo de soldadura se ha relacionado con enfermedades respiratorias (Ozdemir et al. 1995; Bradshaw et al. 1998), enfermedades isquémicas del corazón (Sjogren et al., 2002), la enfermedad de Parkinson (Sriram et al., 2011) y en determinados casos con el riesgo de desarrollar cáncer (IARC 1990; Steenland et al. 1996)

A nivel mundial se han realizado diversos estudios que reportan efectos tóxicos del humo de soldadura en los pulmones de ratón *in vivo* (Antonini et al. 2003; Antonini et al. 2004). Otros estudios en animales de experimentación relacionan la exposición al humo de soldadura y el desarrollo de cáncer (Patti et al. 2008; Zeidler et al. 2008). De igual forma se reportan pocos artículos sobre genotoxicidad del humo de soldadura en humanos (Eliaset al. 1989, Knudsen et al. 1992, Jelmert et al. 1994a, 1995b; Halasova et al. 2008, Iarmarcovai et al., 2005a, 2006b; Sardas et al. 2010; Zhu et al. 2001; Danadevi et al. 2004). A nivel nacional no hay suficientes investigaciones reportadas acerca de la exposición al humo de soldadura y sus efectos sobre la salud humana, por lo tanto se requieren estudios de biomonitorio que evalúen efectos citotóxicos y genotóxicos tempranos en los soldadores y de esta forma alertar sobre los riesgos de salud por esta exposición, de igual forma motivar hacia el diseño de estrategias de prevención y promoción de la salud por parte de entidades gubernamentales.

Para la fácil realización de estudios de biomonitorio es importante emplear pruebas que sean eficientes en el reconocimiento de diferentes efectos en el organismo, un ejemplo es el ensayo citómico (BMCyt), el cual es una prueba sensible para la identificación en individuos de efectos citotóxicos y genotóxicos producidos por la exposición a agentes xenobióticos. El BMCyt aplicado a células exfoliadas del epitelio bucal, es una prueba útil para identificar anomalías nucleares en las células (células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (CP), células carioréticas (CR), células carioplásticas (CL), células binucleadas (BN), micronúcleos (MN) y brotes nucleares (BE)) (Thomas et al., 2011). Las células del epitelio bucal son la primera barrera contra la exposición por vía oral a agentes externos y tienen la capacidad de metabolizar agentes cancerígenos que se encuentran en el ambiente y convertirlos en productos reactivos. Teniendo en cuenta que cerca del 90% de cánceres en humanos se originan en células epiteliales (Rosin 1992), las células exfoliadas pueden brindar

valiosa información en el biomonitorio de poblaciones expuestas a agentes tóxicos como el humo de soldadura (Celik et al., 2010). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del humo de soldadura en personas expuestas ocupacionalmente, mediante el ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. El 19% de todos los casos de cáncer son atribuibles a factores medioambientales, incluido el entorno laboral (OMS 2011). En Colombia, para el 2005 la tasa de mortalidad por cáncer fue del 15%, una cifra que se encuentra relacionada con el estilo de vida, los hábitos nutricionales y la exposición ambiental / ocupacional a agentes químicos (Ochoa and Montoya 2009), incluyendo posiblemente la exposición ocupacional al humo de soldadura. Según la Agencia internacional para la investigación sobre cáncer (1990), el humo de soldadura se encuentra en la categoría de posible cancerígeno (grupo 2B) para humanos debido a que los soldados durante el proceso de soldar están expuestos a una compleja mezcla de gases (monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxido nitrógeno y ozono) y metales particulados (hierro, cadmio, cobre, cromo, aluminio, zinc, estaño y níquel) (Sriram et al., 2011).

Muchos de los componentes del humo de la soldadura por sí solos no son considerados por la IARC como cancerígenos para los humanos, pero mezclados contribuyen al aumento de riesgo de padecer diversas enfermedades (Antonini 2003). La exposición al humo de soldadura se encuentra relacionada con enfermedades respiratorias (Ozdemir et al. 1995; Bradshaw et al. 1998), enfermedades del corazón (Sjogren et al., 2002), desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Sriram et al., 2011) y en determinados casos el riesgo de padecer cáncer de pulmón (Steenland et al., 1996), tráquea, bronquios, estómago e hígado (IARC 1993). Por tal razón es importante realizar monitoreos que permitan en poblaciones expuestas a humo de soldadura evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos causados por esta exposición ocupacional y relacionar estos resultados con un posible riesgo de desarrollar como el cáncer en la población expuesta al humo de soldadura.

Los posibles efectos citotóxicos y genotóxicos generados por la exposición ocupacional al humo de soldadura están relacionados con el fácil ingreso de las partículas al individuo por inhalación (Huang et al. 2008; Turkez et al. 2010), sobre todo en trabajadores que no emplean las mínimas medidas de protección laboral, debido a que el diámetro de los metales particulados que componen el humo de soldadura se encuentra en un rango de 100 nm a 1 μm (Antonini et al., 2006). Por otra parte, los efectos que causan en el organismo los compuestos presentes en el humo de soldadura, pueden estar asociados con la característica iónica de los metales pesados y su capacidad de imitar metales esenciales (Rana 2008), lo cual les confiere una mayor facilidad para entrar a la célula a través de la membrana celular, y una vez dentro pueden formar aductos (uniones covalentes) con el ADN, o como producto de su oxidación generar especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs son moléculas altamente reactivas que pueden interactuar con el material genético y causar lesiones primarias, daños que si no son reparados o

son mal reparados pueden expresarse como una mutación, lo cual es el paso inicial en el proceso cancerígeno (Vodicka et al., 2004) o puede producirse inestabilidad genómica, y muchas veces cuando el daño es irreparable la células deciden eliminar este daño por vías apoptóticas.

En Europa y Asia, han relacionado la exposición al humo de soldadura con daños genómicos como roturas de cadena sencilla, entrecruzamientos en el ADN y diferentes enfermedades (Costa et al. 1993; Jelmert et al. 1994; Halasova et al. 2008). Para el caso de Colombia sólo se encuentra reportado un estudio que evalúa el efecto genotóxico inducido en soldadores por la exposición ocupacional mediante la estimación de la frecuencia de micronúcleos, células con brotes nucleares y células binucleadas (Tejedor, 2011) y no se encuentran reportadas investigaciones acerca de la exposición al humo de soldadura y sus efectos citotóxicos. Según lo anterior, es notable que a esta actividad no se le ha brindado la suficiente atención a pesar de que el proceso de soldar es una actividad muy practicada en todo el mundo y principalmente en nuestro país.

El proceso de soldar es una actividad común a nivel mundial en la que se desempeñan alrededor de 5 millones de personas (Bureau of Labor Statistics 2011). En nuestro país no se tienen datos del número de trabajadores dedicados a esta labor en el sector informal, y no ha sido suficientemente evaluados los problemas de salud asociados con la exposición ocupacional al humo de soldadura. Según la principal empresa de fabricación y comercialización de electrodos para soldar, West Arco (2010), en Colombia el mercado de la soldadura mueve alrededor de \$150.000 millones de pesos al año, genera más de 150.000 empleos directos y 200.000 indirectos. Además, el aumento de los proyectos de infraestructura y el crecimiento de la construcción en el país, a futuro multiplicará la demanda de la mano de obra y a su vez la población de soldadores. Esta situación hace pensar que el desarrollo de estudios que evalúen los diferentes efectos citotóxicos y genotóxicos de la exposición al humo de soldadura, permitirán reconocer los eventos iniciadores de problemas de salud como el cáncer ocupacional y de esta forma adoptar diferentes medidas de control y prevención en la población de soldadores colombianos específicamente de Popayán.

En Popayán existe más de 50 talleres de soldadura y por consiguiente el número de personas expuestas al humo de soldadura es alto. Al observar las condiciones en las que trabaja el personal de estos talleres, es evidente la falta de equipos de ventilación y equipos de protección personal eficaces para evitar un mayor ingreso de los humos de soldadura por vía dérmica o respiratoria. La mayoría de estos trabajadores no pueden acceder a los servicios de una entidad prestadora de servicio de salud (EPS) debido a su bajo nivel socioeconómico y educativo. De acuerdo a todas estas características, los soldadores son una población vulnerable, es una problemática de salud pública ocupacional por la exposición al humo de soldadura, por lo tanto es pertinente el desarrollo de estudios científicos

que brinden herramientas para la creación de normativas que regulen esta actividad, y de esta forma prevenir de manera temprana el desarrollo de enfermedades de origen ocupacional como el cáncer entre otras.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la exposición ocupacional a agentes químicos es muy alta y el estudio en humanos sobre los efectos cancerígenos de determinados compuestos potencialmente nocivos para la salud no ha sido estudiado lo suficiente, como es el caso de la exposición al humo de la soldadura. El humo de soldadura es considerada por la IARC (1990) como posible agente cancerígeno (2B) para humanos debido a la ausencia de estudios que puedan identificar efectos mutágenicos, cancerígenos y teratógenicos (Ward et al., 2010). Por tal motivo es importante realizar estudios que brinden información sobre esta exposición y de esta forma lograr establecer el riesgo que representan para la salud del ser humano la misma.

Existe poca evidencia relacionada con el efecto del humo de soldadura sobre el material genético y la susceptibilidad genómica de los individuos expuestos, los pocos estudios que se encuentran presentan diferencias en cuanto al biomarcador, las poblaciones objeto de estudio de trabajadores y la duración de la exposición (Husgafvel and Siemiatycki 2010). Estas investigaciones no permiten tener una comprensión de los posibles efectos adversos para la salud por éste tipo de exposición. Para la población de soldadores es fundamental que se evalúe el riesgo por la exposición ocupacional para motivar al desarrollo de estrategias de prevención a partir de estudios que describan los efectos citotóxicos y genotóxicos en poblaciones expuestas ocupacionalmente al humo de soldadura mediante ensayos de fácil ejecución como el citómico.

Debido a la amplia exposición de agentes químicos en el ambiente o en el entorno de trabajo es importante realizar biomonitoreos que emplen biomarcadores que permitan evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad por la exposición a agentes ambientales / ocupacionales, un ejemplo de ello es el ensayo citómico (BMCyt) en células exfoliadas del epitelio bucal, el cual es de gran utilidad debido a que permite estimar el daño citotóxico y genotóxico mediante el incremento de la frecuencia de anomalías nucleares (células con cromatina condensada, células picnóticas, células carioréticas, células cariolíticas, células binucleadas, micronúcleos y brotes nucleares) y relacionarlas con variables como la exposición a agentes xenobióticos, en este caso al humo de soldadura, el tiempo de exposición ocupacional y la edad de la población objeto de estudio. El BMCyt es un método mínimamente invasivo en el momento de la toma de la muestra, tiene costos relativamente bajos comparados con otras pruebas (cultivos de linfocitos, ensayo cometa, etc.), y las preparaciones citogenéticas tienen un fácil almacenamiento. El BMCyt se realiza en tejido de la mucosa bucal que se encuentra en constante replicación, permitiendo evaluar daños en el ADN sin necesidad de replicación *ex vivo*, ni del establecimiento de cultivos celulares. También permite evaluar el daño citotóxico y genotóxico, después de una exposición aguda o crónica porque se realiza con células del epitelio bucal, las

cuales son la primera barrera del organismo contra los xenobióticos que entran al organismo por inhalación como es el caso de humo de la soldadura. (Turkez et al., 2010). Luego, el ensayo citómico es una herramienta útil para la evaluación del daño en el ADN de personas expuestas ocupacionalmente al humo de soldadura.

En el BMCyt se analiza la frecuencia de micronúcleos (MN), un biomarcador genotóxico que ha sido validado como predictor de riesgo de cáncer en linfocitos de sangre periférica (Bonassi et al., 2007). Se cree que en el epitelio bucal puede predecir etapas premalignas, tales como la leucoplasia oral y riesgo de desarrollar cáncer en la cavidad oral (siendo este tipo de cáncer uno de los 10 más comunes según la OMS), en el tracto del epitelio digestivo superior u otro tipo de tejido epitelial, lo cual sería muy prometedor en la prevención del cáncer debido a que cerca del 90% de cánceres en humanos son de origen epitelial (Rosin 1992). Sin embargo, existe un **vacío o brecha** de conocimiento que indique que la elevada frecuencia de MN en células exfoliadas del epitelio bucal está relacionada con la exposición al humo de soldadura y el riesgo de desarrollar cáncer en este tejido u otro tipo de células en diferentes tejidos. Actualmente existe el proyecto HUMN_{xL} (Human micronucleus exfoliated) para evaluar diferentes variables que afectan la frecuencia de micronúcleos y otras anomalías nucleares en células exfoliadas humanas (HUMN_{xL}) con el fin de validar el biomarcador de MN, a partir de la búsqueda y análisis de resultados obtenidos en diferentes estudios de biomonitorio genético empleando células exfoliadas que permitan identificar y cuantificar las variables que afecten este biomarcador (Holland et al., 2008). Luego, con el desarrollo y publicación de este estudio en una revista científica se puede contribuir para ser tenido en cuenta al momento de la caracterización y validación del biomarcador de MN y anomalías nucleares en células epiteliales como predictor de riesgo de desarrollar cáncer y en la descripción de factores de riesgo ambientales.

De igual forma es evidente que debido a la gran población de soldados colombianos esta problemática debería ser un tema de interés nacional y es importante que el Ministerio de Salud desarrolle políticas enfocadas a la promoción y prevención en salud en la población de soldados, debido a que ellos mismos tienen un papel decisivo en la prevención de los riesgos laborales, y para esto es necesario que cuenten con toda la información acerca de los riesgos característicos de su trabajo que pueden brindar los estudios realizados en estas poblaciones para que ellos puedan crear conciencia y de esta forma emplear todas las medidas necesarias para eliminar o minimizar los efectos negativos sobre su salud y mejorar su calidad de vida.

En Colombia no se tiene un número exacto de trabajadores informales que se desempeñan como soldados. Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, la proporción de trabajadores informales en trece ciudades representativas del país, para el trimestre móvil septiembre – noviembre de 2012 fue de 51.6%, una cifra que incluye personas que trabajan informalmente como

soldadores. A pesar de esto, en Colombia no existe un programa de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional sobre esta población y a la fecha sólo se cuenta con la identificación de diferentes enfermedades de origen ocupacional (asma ocupacional, siderosis, fiebre de humos metálicos, etc.), las cuales son las mayores causas de consulta en entidades de salud (Tafur 2005). En realidad la carencia de estudios a nivel regional, nacional y mundial sobre el efecto del humo de soldadura, hace necesario realizar y publicar diversas investigaciones que puedan brindar información importante para evaluar si este agente es un inminente carcinógeno para los humanos, mediante la utilización de ensayos mínimamente invasivos de fácil aplicación en biomonitoreos de poblaciones expuestas, como el empleo del ensayo citómico.

El desarrollo de este estudio fue viable porque se contó con una población que pudo ser encontrada en talleres de soldadura informales en diferentes puntos del municipio de Popayán. Por otra parte, el estudio cumplió con todas las normas científicas, técnicas y administrativas establecidas por el Ministerio de Salud Colombiano (MSC) y se contó con la infraestructura, equipos, laboratorio y conocimiento de la técnica que fueron necesarios para el desarrollo de la investigación. Estas características fueron necesarias para obtener buenos resultados para darlos a conocer a la población objeto de estudio en un curso llamado “Salud y Trabajo” y así lograr cumplir con el propósito de este estudio que fue motivar y crear conciencia en la población de soldadores para que tomen una actitud diferente en su entorno laboral, mediante la implementación de EPPs (equipos de protección personal) como máscaras, guantes y delantal de cuero. De esta manera se espera contribuir con la disminución del efecto citotóxico y genotóxico ocasionado por la exposición ocupacional y a su vez prevenir el desarrollo de diferentes problemas de salud para asegurar una mejor calidad de vida. De igual forma con la publicación de este estudio también se quiere dar información útil acerca de las diferentes variables que pueden influenciar en la frecuencia de los biomarcadores del ensayo citómico y de igual forma se pretende contribuir a los pocos estudios que existen acerca de la exposición al humo de soldadura para que sea tenido en cuenta en la caracterización de esta exposición y a su vez alertar a diferentes entidades gubernamentales para que realicen políticas de prevención y promoción en salud en la población de soldadores.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 HUMO DE SOLDADURA

El proceso de soldar es unir dos piezas de metal mediante la aplicación de altas temperaturas. En este proceso se da la producción de un humo con una mezcla de material particulado conformado por hierro, cadmio, cobreo, cromo, aluminio, zinc, estaño y níquel (metales pesados) y de gases (Monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxido de nitrógeno y ozono) que depende de las condiciones particulares de cada trabajo: la pieza de soldar (ver tabla 1), los posibles recubrimientos superficiales en el proceso de soldadura (ver tabla 2), los materiales de aporte utilizados en el proceso de soldadura (ver tabla 3), el aire en la zona de soldadura y su posible contaminación y ventilación en el lugar de práctica de la soldadura. La inhalación de estos compuestos puede conducir a trastornos de salud, como intoxicaciones agudas y enfermedades profesionales de muy diversa naturaleza (Rojas 2009). Cada metal tiene asignada una concentración máxima en el aire, conocida como Valor Límite Ambiental (VLA) (ver figura 1) por debajo del cual se considera que en base a los acontecimientos actuales sobre su toxicidad. En la medida que se superen estos límites aumentarán las probabilidades de que los daños se manifiesten (OSALAN 2009).

Tabla 1. Contaminantes procedentes del metal base de las piezas

CONTAMINANTES PROCEDENTES DEL METAL BASE DE LAS PIEZAS		
OPERACIONES	Metales bases más frecuentes	Contaminantes. característicos Oxidos de
Soldadura, Por cualquier procedimiento en el que se produzca la fusión del material base de la pieza	Aceros al carbono	Hierro. Manganeso.
	Aceros aleados	Hierro. Manganeso. Cromo. Níquel
	Aceros inoxidables	Hierro. Manganeso. Cromo. Níquel
	Aluminio	Aluminio
	Bronces	Cobre. Estaño (Níquel. Plomo. Zinc. Berilio)
	Latón	Cobre. Zinc. (Estaño. Manganeso. Plomo)

Tomado de OSALAN 2009.

Tabla 2. Contaminantes procedentes del recubrimiento de las piezas.

CONTAMINANTES PROCEDENTES DEL RECUBRIMIENTO DE LAS PIEZAS			
OPERACIONES	Recubrimientos más frecuentes	Contaminantes característicos	
Soldadura. Procedimiento que se produzca la fusión del recubrimiento de la pieza	Recubrimientos metálicos	Galvanizado	Hierro. Manganeso.
		Cromado	Hierro. Manganeso. Cromo. Níquel
		Níquelado	Hierro. Manganeso. Cromo. Níquel
		Cobreado	Aluminio
		Cadmiado	Cobre. Estaño (Níquel. Plomo. Zinc.)

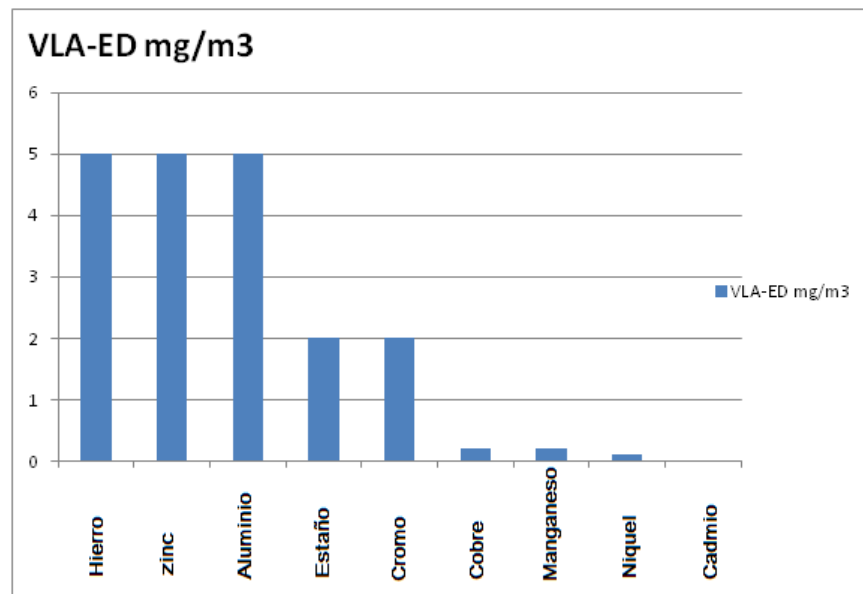
Tomado de OSALAN 2009

Tabla 3. Contaminantes procedentes de los materiales de aporte.

CONTAMINANTES PROCEDENTES DE LOS MATERIALES DE APORTE			
Materiales de aporte	Tipo de soldadura	Contaminantes característicos	
Electrodo revestido	Manual al arco eléctrico	Todos	Oxidos de hierro y manganeso.
		Ácido	Silice amorfa.
		De rutilo	Óxido de titanio
		Básico	Fluoruros
	Tipo de revestido	Celulósico	Monóxido y Dioxido de carbono (CO y CO ₂)
		Grafito cobreado	Oxido de cobre. Monóxido y Dioxido de carbono (CO y CO ₂)
		Otros especiales	Ségun los casos: Óxido de cobre, zinc, plomo, níquel y cromo

Tomado de OSALAN 2009

Figura 1. LÍMITES DE EXPOSICIÓN PROFESIONAL DE ALGUNOS HUMOS METÁLICOS DE SOLDADURA



Tomado de Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) 2009

3.2 HUMO DE SOLDADURA: ABSORCIÓN Y METALES PESADOS

La absorción de los componentes del humo de soldadura puede darse de dos formas, ingresando directamente en el epitelio bucal o pasar al sistema respiratorio y posteriormente al sistema circulatorio, de esta forma son transportados por todo el torrente sanguíneo específicamente por los linfocitos

(Stellman and Finklea 1999), células que se encuentran en estado no proliferativo y tienen un largo tiempo de vida permitiendo la acumulación de lesiones primarias en el ADN por la exposición a determinados agentes xenobióticos y a su vez tiene contacto con las células exfoliadas del epitelio bucal.

El epitelio bucal es una barrera muy eficiente contra agentes genotóxicos y cancerígenos, además la capa de queratina que cubre el epitelio bucal opone mucha resistencia a la difusión de la mayoría de las sustancias químicas. No obstante, en el caso de algunas sustancias suele producirse una absorción dérmica significativa como resultado de la toxicidad de sustancias liposolubles altamente tóxicas como lo son varios metales pesados (Stellman and Finklea 1999), en efecto estos elementos interactúan directamente con las células basales que conforma el epitelio bucal, causando el aumento en la frecuencia de anomalías nucleares. El ingreso de los metales presentes en el humo de soldadura al interior celular es fácil por su capacidad iónica y puede darse de tres formas: si el metal es aniónico es bien acogido por la célula y penetra sin problemas por los canales de aniones. Si esta en forma de cationes divalentes atraviesa la membrana células por los transportadores de cationes. La membrana plasmática es impermeable a iones trivalentes pero estos entran al interior celular por fagocitosis. Los cationes de metales tóxicos se unen a ligandos biológicos de carga opuesta tales como ácidos de aminoácidos de la cadena lateral de las proteínas y grupos fosfatos de nucleótidos o ácidos nucleicos. (Besyerseman et al., 2008). Una vez halla este tipo de uniones se pueden inhibir o activar muchas enzimas desestabilizando el equilibrio celular y produciendo diferentes respuestas celulares. De igual forma la unión por la afinidad nucleófila de muchos metales al ADN produce la formación de aductos (Bernard 2011). La unión de estos metales ocasionan ruptura en una de las cadenas del ADN, una lesión que de no ser reparada o ser mal reparada pueda producirse una mutación la cual es considerada como el evento inicial en el proceso de carcinogénesis (Vodicka et al., 2004).

Entre los componentes del humo de la soldadura y los efectos tóxicos asociados por estos componentes en el ser humano se encuentra el **hierro (Fe)** que en exceso, lleva al deterioro de funciones relevantes como la respiración celular, oxidación de hierro, formación de pigmentos, biosíntesis de neurotransmisores, formación de tejido conectivo y defensa antioxidante (Tapia and Araya 2006). El exceso de Fe libre cataliza reacciones de óxido-reducción, produciendo radicales libres y peroxidación lipídica (Lim *et al.*, 2010). No existe un mecanismo específico de eliminación de Fe y se limita a 1 mg/día (por exfoliación del epitelio intestinal y durante el periodo menstrual). El hierro es el metal que se encuentra en mayor proporción en el humo de soldadura y el hígado es el principal sitio de almacenamiento de este metal por lo que es susceptible de daño por acumulación del hierro (Cox and moore 2002).

El cadmio (Cd) es conocido como un metal que deriva sus características toxicológicas de su semejanza química con el zinc que es un micro-elemento esencial para las plantas, los animales y los seres humanos. El Cd se bioacumula en seres humanos y la exposición a largo plazo se asocia a disfunción renal, enfermedad obstructora del pulmón y cáncer en el mismo órgano; el Cd también puede producir efectos nocivos en el tejido óseo (osteomalacia, osteoporosis) (Lymberopoulos et al., 2000). El Cd inhalado es 60 veces más tóxico que el ingerido, se deposita en la corteza renal y huesos, no presenta biotransformación y se elimina sólo el 0.01% de su contenido total por vía gastrointestinal y renal (Kobayashi et al., 1985)

El cobre (Cu) tiene gran influencia sobre la vida humana, pero en exceso produce daño en el hígado y el riñón e irritación de las paredes del estómago. La exposición a exceso de Cu en el hígado lleva eventualmente al daño hepático. A su presencia se le atribuye también daño neurodegenerativo y afecciones del sistema nervioso. (Martínez et al. 2003). Por otra parte **el cromo (Cr)** puede presentarse en diferentes formas iónicas en el organismo, el Cr^{+3} tiene baja toxicidad, mientras que el Cr^{+6} es reconocido como tóxico, carcinógeno humano, con actividad mutagénica, debido a la capacidad de estos iones de producir EROs (Antonini 2003).

La inhalación, depósito y acumulación de partículas de **aluminio (Al)** en el pulmón está relacionado con el desarrollar fibrosis pulmonar (Martínez., 2001). En cuanto al **Zinc (Zn)**, este es reconocido como agente inductor aneugénico y clastogénico, la exposición prolongada a este metal se relaciona con disfunción renal y problemas respiratorios (Dogaliuk et al., 2001). Para el **estaño (Sn)**, cuando éste es inhalado en forma de polvo o humos, produce diversas patologías respiratorias, neumoconiosis (siderosis) y otras enfermedades asociadas a inhalación de metales como la fibrosis (Mitchell et al., 1961). En cuanto al **Níquel (Ni)**, éste es clasificado como un carcinógeno humano (NIOSH, 1977). El Ni se ha evaluado en sistemas bacterianos y se observa que este es potencialmente mutagénico (Antonini 2003). Otro compuesto componente del humo de soldadura es el manganeso (Mn) y su presencia es atribuida al revestimiento de los electrodos. Recientes estudios han mostrado que la exposición repetida a humo de soldadura causa una acumulación selectiva de Mn en el cerebro causando anomalías dopaminérgicas. (Sriram et al., 2010^a, 2010^b), como se mostro cambios en la función mitocondrial. (Siriam et al., 2012)

Por otra parte también se conoce que los metales pesados son compuestos peligrosos que tienden a bioacumularse (aumento en la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparado a la concentración del producto químico en el ambiente)(Pereira et al., 2004), y tienen dos mecanismos que son de particular importancia al interior celular que inhiben enzimas, como la interacción entre el metal y el grupo sulfhidrilo (SH) de la enzima

o el segundo mecanismo es cuando metal puede desplazar a un metal cofactor esencial de la enzima (Ellen and Silbergeld 2000).

Recientemente Beyersmann et al., (2008), describieron 3 mecanismos predominantes de la genotoxicidad de los metales. El primero es acerca de la interferencia con la regulación redox al interior celular y la inducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) produciendo estrés oxidativo el cual causa daño oxidativo en el ADN que si no es reparado o es mal reparados y la célula continua con el proceso de división puede producir mutaciones que son el paso inicial en el proceso cancerígeno (Vodicka et al., 2004) o en otros casos si los daños ocasionados son irreparables posiblemente las células eliminan este daño por la vía de la muerte celular. También el estrés oxidativo puede desencadenar cascadas de señales y causar la estimulación del crecimiento celular (Beyersmann et al., 2008). El segundo es la inhibición de los sistemas de reparación del ADN que conlleva a la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones críticas. El tercer mecanismo es la desregulación de la proliferación por la inducción de vías de señalización o la inactivación del control de crecimiento como por ejemplo genes supresores de tumores. (Cooke et al. 2003; Schins et al. 1999).

La carcinogénesis de los metales pesados en la actualidad está poco entendida y existen numerosas controversias (ATSDR 1993). La toxicidad y niveles perjudiciales de los elementos inorgánicos dependen de la capacidad de degradación de los organismos y la capacidad que tienen éstos de bioacumularse. En general, la genotoxicidad de los metales es causada por mecanismos indirectos a través de propiedades fisicoquímicas. Una causa muy probable de carcinogénesis es el aumento de lesiones en el ADN que no sean reparadas, el aumento en la generación de EROs y/o la interferencia de procesos de reparación. Se cree que las EROs juegan un papel importante de la genotoxicidad lo cual puede estar relacionado con la presencia de metales de transición, la movilización de hierro al espacio intracelular y la peroxidación lipídica (Schins 2002).

3.3 DAÑO GENÓMICO: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LESIÓN PRIMARIA DEL ADN

Uno de los mecanismos 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 ($\cdot\text{OH}$), anión 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 son compuestos electrofílicos que presentan afinidad por los centros nucleofílicos de las bases nitrogenadas que componen la molécula de ADN, especialmente las purinas. (Norbury and Hickson 2001). No siempre estas lesiones primarias en el ADN son reparadas eficientemente. En algunos casos, polimorfismos en los genes que codifican las proteínas involucradas en los procesos de reparación, sumado a la exposición aguda a xenobióticos, deficiencias en la alimentación, y la edad, conllevan a una reparación deficiente o

no reparación, que pueden ser evidenciadas por la formación de micronúcleos. Estas anomalías conducen a la generación de mutaciones, las cuales son de carácter irreversible y están asociadas con diversas enfermedades, entre ellas el cáncer (Vodicka et al., 2004)

3.4 BIOMONITOREO Y BIOMARCADORES

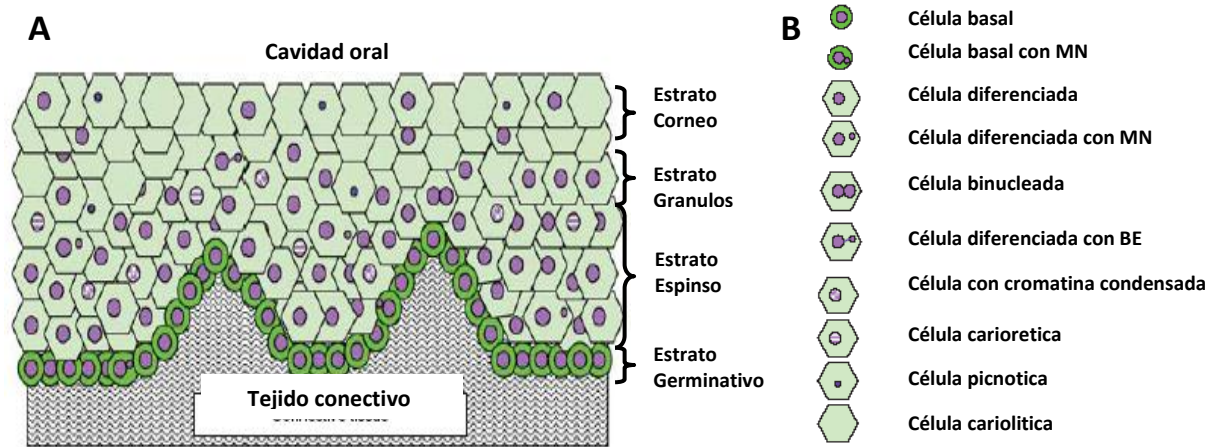
El biomonitoreo o monitoreo biológico puede definirse como la medición repetida y controlada de marcadores bioquímicos en los fluidos, tejidos u otras muestras accesibles de sujetos expuestos en el pasado o en el presente a factores de riesgo químicos, físicos o biológicos en el lugar de trabajo y/o el medio ambiente en general. Además, el biomonitoreo no sólo se refiere a la evaluación de la exposición, sino también, al efecto y 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). Los biomarcadores son 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).

3.5 ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL

El tejido epitelial constituye una de las primeras barreras para los agentes genotóxicos o carcinógenos. La capa basal de este tejido está en constante división razón por la cual más del 90% de los tipos de cáncer aparecen en los tejidos epiteliales como los de la cavidad oral. Por lo tanto el análisis de la frecuencia de anomalías nucleares presentes en las células exfoliadas del epitelio bucal que hacen parte del ensayo citómico, es una herramienta útil para medir el impacto que tiene la exposición a químicos sobre el material genético (Fenech et al., 1999)

El epitelio bucal está conformado por dos tejidos uno conectivo y otro epitelial que está en contacto con el exterior y presenta cuatro estratos distintos (ver figura 1), cada uno con diversos tipos de células que pueden presentar anomalías nucleares las cuales serán indicadores de daños en el ADN producidos por diferentes factores como la exposición a químicos. (Fenech et al., 1999).

Figura 1. Ubicación espacial de los estratos y las células del epitelio bucal.



MN: Micronúcleos ; BE: brote nuclear

A. Estratificación del tejido epitelial bucal. B. Anomalías nucleares. Fuente tomada y modificada Thomas et al., 2009

Entre los estratos del tejido epitelial el externo es el córneo, constituido por células queratinizadas diferenciadas que se exfolian constantemente como producto del desgaste, debajo de él está el estrato granuloso, que se caracteriza por células diferenciadas que tienen gránulos de queratohialina para producir queratina, en tercer lugar está la capa espinosa con células diferenciadas apoptóticas (células con cromatina condensada, células picnóticas, células carioréticas, células cariolíticas y células binucleadas), el estrato más interno es el basal donde se encuentran las células en constante división, migrando hasta el estrato más externo durante un periodo de 7-21 días, por lo tanto es en este lugar donde el daño genético que no es reparado o está mal reparado se expresa como micronúcleos y también en esta capa se encuentran células Binucleadas, y brotes nucleares (Ver figura 1) (Holland et al. 2008; Thomas et al. 2009).

3.5.1 Anomalías nucleares de células indicadoras de efecto citotóxico. Las **células con cromatina condensada (CC)** tienen un núcleo, con regiones condensadas con aspecto moteado o estriado donde es evidente áreas con pérdida de cromatina. Estas células tal vez están sometidas a primeras etapas de apoptosis, aunque esto no ha sido demostrado. En este tipo de células es posible encontrar micronúcleos pero no deben ser tenidos en cuenta en el ensayo (Thomas et al., 2009). Por otro lado las **células picnóticas (CP)** tienen un pequeño núcleo reducido, con alta densidad de material nuclear uniforme e intensamente teñido. La importancia biológica de estas células es desconocida, pero se cree que son células sometidas a una forma de muerte celular; sin embargo, el mecanismo exacto de su formación sigue siendo desconocido (Thomas et al., 2009). En cuanto a las **células carioréticas (CR)**, éstas presentan una condensación de cromatina más extensa, con fragmentación y desintegración

eventual del núcleo. Estas células pueden estar sometidas a una etapa tardía de la apoptosis, pero esto no ha sido demostrado de manera concluyente (Thomas et al., 2009). Para el caso de **las células cariolíticas (CL)** el núcleo está completamente agotado de ADN y no tiene ninguna tinción diferencial (Feulgen). Probablemente representen una etapa muy tardía en el proceso de muerte celular, pero esto aún no ha sido demostrado (Thomas et al., 2009). Por otra parte las **células binucleadas (CB)** son células con dos núcleos que están por lo general cerca uno del otro, con la misma morfología de las células normales. La importancia de estas células es desconocida, pero puede ser indicador de problemas en la citocinesis después de la última la división nuclear (Ver figura 1). Otros autores consideran que esta anomalía se produce por la formación de aneuploidias. Si se toma esta explicación de la formación de células binucleadas esta anomalía debe ser tomada como indicadora de efecto genotóxico (Shi and King et al., 2007) (Bonassi et al., 2011) (Ver figura 1).

3.5.2 Anomalías nucleares de células indicadoras de efecto genotóxico. Los micronúcleos (MN) son pequeños núcleos con un diámetro de la tercera a la dieciseisava parte del núcleo principal, los cuales contienen ya sea un cromosoma entero rezagado o un fragmento acéntrico que durante el ciclo de división celular no fue incorporado correctamente en el núcleo principal (Fenech 2006). Para el caso de los **Brotos nucleares (BE)**, estos son marcadas protuberancias que tiene el núcleo principal unido entre sí. Se cree que los BN se originan por la eliminación de material nuclear. El mecanismo que conduce a esta morfología no se conoce, pero puede ser debido a la eliminación de ADN amplificado o complejos de reparación del ADN (Fenech and Crott 2002)

3.5.3 Validación de la prueba de Micronúcleos (MN) en Linfocitos de sangre periférica y del ensayo citómico en células exfoliadas como predictor de riesgo de cáncer

La validación de biomarcadores se realiza para mostrar la eficiencia y exactitud de un biomarcador en el reconocimiento de eventos tempranos para el pronóstico y prevención de enfermedades como el cáncer. El proceso de validación consta de 3 etapas la primera es la del desarrollo del biomarcador, la segunda es la caracterización del mismo, etapa en la que se realiza comparación entre laboratorios para la estandarización de protocolos y caracterización de variables que puedan afectar el biomarcador y la última etapa se basa en la realización de estudios epidemiológicos longitudinales.

Según Bonassi (2007), la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica (LSP) es ampliamente utilizada como biomarcador de daño cromosómico e inestabilidad genómica en poblaciones humanas y el aumento de la frecuencia de MN en LSP está relacionado con el desarrollo de cáncer. Antes de considerar a los MN en LSP como predictores de riesgo de desarrollo de cáncer fue necesario realizar estudios prospectivos de cohorte donde se proporciona la evidencia sobre

el incremento en la frecuencia de MN y el riesgo de desarrollar esta enfermedad en personas sanas. Para este fin se obtuvo la frecuencia de MN de estudios rutinarios de vigilancia citogenética, seleccionados de la base de datos del proyecto HUMN seguido por la incidencia de cáncer o mortalidad. Finalmente en el 2008 se publicó un estudio de casos y controles que validaba el ensayo de MN en LSP como biomarcador de riesgo de cáncer (Murgia, Ballardin et al., 2008), donde participaron 1650 individuos de los cuales se registraron 111 muertes, 52 por cáncer. También se evaluó la frecuencia de MN en 49 casos de cáncer y en 101 controles donde la frecuencia de MN en LSP fue significativamente mayor en los casos de cáncer que en los controles. Se concluyó que en individuos con alta frecuencia de MN se incrementaba el riesgo de muerte por cáncer en comparación con personas que tenían baja frecuencia de MN.

Después de la exitosa experiencia obtenida con el proyecto HUMN sobre la frecuencia de micronúcleos en LSP en poblaciones humanas, se inició un nuevo proyecto basado en el ensayo de MN y otras anomalías nucleares (BE, CC, PC, CR CL y BN) en células exfoliadas del epitelio bucal (Fenech et al., 2007). Los objetivos del nuevo proyecto HUMN_{XL} son la comparación y estandarización del protocolo de recogida, procesamiento, tinción y selección de las células bucales. El segundo objetivo es la comparación de la frecuencia de MN y otras anomalías nucleares espontáneas e inducidas y la influencia de variables clave (edad, sexo, tabaquismo y exposición ocupacional) en las frecuencias basales de MN y las otras anomalías nucleares en células bucales. El tercer objetivo es la evaluación de MN como biomarcador de riesgo de cáncer epitelial, con un estudio prospectivo que asocie la frecuencia de MN con el riesgo de padecer cáncer en células exfoliadas. Luego esta necesidad de información por parte del HUMN_{XL} ha despertado interés en la participación de muchos laboratorios alrededor del mundo y se espera seguir contribuyendo con diferentes trabajos de interés a este consorcio.

3.6 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS MOLECULARES Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

La epidemiología molecular es un campo prometedor, debido al desarrollo constante de nuevas técnicas para entender la etiología, la susceptibilidad genética y los mecanismos relacionados con la inducción de diferentes patologías. En estos estudios el uso de biomarcadores es fundamental debido a que aportan información útil para predecir el desarrollo de muchas enfermedades y a su vez para el diseño y ejecución de programas de prevención de las mismas (Bonassi and Au, 2002). Luego, estudios como este en poblaciones expuestas a agentes citotóxicos y genotóxicos permite alertar, reflexionar y motivar a organismos gubernamentales que controlan la salud de trabajadores, hacia el diseño y ejecución de políticas y estrategias de promoción de la salud para actuar de manera temprana y de esta forma eliminar o reducir la exposición ocupacional a un posible cancerígeno como el humo de soldadura.

4. ANTECEDENTES

Luego de realizar una búsqueda exhaustiva en diferentes bases de datos, tales como Hinari (Reserch in health), Science Direct (Elsevier), Medline, ISI web of Science y Scielo (Scientific Electronic Library Online), se encontró que existe un gran número de estudios *in vivo* (en animales) que evalúan los efectos tóxicos y genotóxicos de la exposición al humo de soldadura (Antonini et al. 2003; Antonini. 2004; Patti et la. 2008;Zeidler et al. 2008), sin embargo el número de estudios realizados en poblaciones humanas expuestas al humo de soldadura es reducido. Para evaluar el efecto genotóxico de la exposición al humo de soldadura se han empleado diferentes marcadores como el aumento del estrés oxidativo expresado en la formación de 8-hidroxy-2'-deoxyguanosina (8-OH-dGs) y biomarcadores de daño genético como alteraciones cromosómicas (AC_s), intercambio de cromatides hermanas (ICH_s), micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica (LSP), y en células exfoliadas del epitelio bucal. Un estudio en células exfoliadas del epitelio bucal incluye 3 marcadores de los 5 utilizados en este estudio para evaluar el efecto citotóxico por la exposición al humo de soldadura, como se logra evidenciar a continuación.

Hasta el momento sólo se ha realizado un estudio que permite medir estrés oxidativo en soldadores, en esta investigación emplearon un biomarcador de exposición 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OH-dGs) medido en orina de soldadores y se observó un incremento estadísticamente significativo de este marcador entre las muestras pre y post turno de la jornada laboral de los trabajadores comparado con el grupo referente (no expuestos) (Nuernberg et al., 2008). Existen varios estudios realizados en poblaciones expuestas al humo de soldadura que emplean el biomarcador de intercambio de cromatides hermanas (ICHs), en dos de estos se encontró un incremento significativo de ICHs en comparación con los grupos referentes (Costa et al. 1993; Zhitkovich et al. 1998), mientras que otros mostraron inconsistencias en cuanto a emparejamiento de la muestra y criterios de selección de la muestra poblacional (Werfel et al. 1998; Knudsen et al. 1992).

Por otra parte algunos estudios citogenéticos han demostrado aumentos significativos en la frecuencia de alteraciones cromosómicas de la población de soldadores respecto a los grupos referentes (Elias et al. 1989; Knudsen et al. 1992; Jelmert et al. 1994), mientras que otros estudios no mostraron un aumento significativo (Jelmert et al. 1995; Halasova et al. 2008). De igual forma existen reportados biomonitoreos que emplean el ensayo cometa para evaluar el daño en el ADN, en un estudio realizado en la India, en una población de soldadores los niveles de Cr y Ni en la sangre de los individuos se correlacionó positivamente con el daño en el ADN que fue evidenciado a través del aumento de la longitud de cola (parámetro de medición) al comparar el grupo de soldadores con el grupo referente (no expuesto), en este estudio también se encontró que el habito de

fumar no tenía efecto significativo sobre el daño en el ADN de la población objeto de estudio, pero el tiempo de exposición sí tenía influencia sobre el daño en el ADN (Danadevi et al., 2004). Otra investigación reporta un incremento significativo del porcentaje de ADN de la cola (parámetro de medición) en una población de soldadores en Turquía, con respecto a una población de pintores y el grupo referente (no expuesto) (Sardas et al., 2010), este estudio reportó que había correlación entre el tiempo de exposición y el daño genético. En China, en una fábrica de manufactura de buses se realizó un estudio donde se evaluó el daño en el ADN mediante el ensayo cometa y se encontró que el grupo expuesto a soldadura no presentaba una diferencia significativa para el daño en el ADN en comparación al grupo referente (no expuesto) (Zhu *et al.*, 2001). Al igual que el estudio de Sardas et al. (2010) este también reportó asociación entre el daño genómico y el tiempo de exposición.

En cuanto a estudios de biomonitorio que emplean el biomarcador de micronúcleos (MN), se observó una mayor frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica, tanto con presencia y ausencia de centrómero en soldadores ($n = 27$), que trabajaban sin dispositivo de protección frente a los referentes ($n = 30$) (Iarmarcovai et al. 2005; Iarmarcovai et al. 2006). En investigaciones que emplearon células exfoliadas del epitelio bucal se encontró una alta frecuencia de MN asociada con el aumento de la duración de la exposición de los soldadores, así como a los niveles de cromo en sangre y el aumento de la edad de los individuos de la población, este estudio trabajó con una población de 53 expuestos y 58 referentes, de igual forma este estudio empleó individuos de ambos géneros (Danadevi et al., 2004). En Cuba se realizó un estudio en soldadores donde también se analizó micronúcleos y otros tipos de anomalías nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal como células binucleadas (BN), células cariolíticas (CL), células con cromatina condensada (CC) y células picnóticas (CP), se empleó una población de 11 soldadores y 11 referentes (no expuestos), finalmente no se encontró un incremento significativo en la frecuencia de todas estas anomalías entre los soldadores y los referentes (Odio et al., 2005). En un trabajo realizado en Cartagena (Colombia), se realizó un análisis de anomalías nucleares como micronúcleos, células binucleadas y células con brotes nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal en una población expuesta al humo de soldadura y se encontró una frecuencia mayor, estadísticamente significativa en células binucleadas y células con brotes nucleares en el grupo expuesto ($n = 36$) frente al grupo referente ($n = 16$), mientras que no se observó una frecuencia mayor estadísticamente significativa en MN de soldadores respecto a los referentes (Tejedor 2011).

De acuerdo a lo anterior se reportan pocos estudios que evalúan efectos citotóxicos y genotóxicos realizados en poblaciones expuestas ocupacionalmente al humo de soldadura, sin embargo en cuanto a la aplicación del ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal al buscar en la literatura se encuentra que éste es ampliamente utilizado para evaluar otro tipo de exposiciones y en varios

casos en personas con algunas enfermedades. Se reportan resultados significativos de algunas anomalías en grupos de exposición ocupacional a solventes, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), gasolina, arsénico y drogas antineoplásicas. También se observó una relación estadísticamente significativa entre el aumento en la frecuencia de MN y cáncer oro faríngeo (Bonassi et al., 2011). El ensayo citómico también ha sido empleado para identificar efectos citotóxicos y genotóxicos ocasionado por enfermedades neurodegenerativas como alzheimer y síndrome de down. Para alzheimer no se observó un incremento significativo en la frecuencia de MN entre personas enfermas comparadas con personas sanas. Para la frecuencia de células basales, células con cromatina condensada (CC) y células carioplásticas (CL) se observó un incremento estadísticamente significativo en los pacientes enfermos con alzheimer comparados con las personas sanas (Thomas et al., 2007). Para el síndrome de down se reportó un incremento estadísticamente significativo de la frecuencia de MN y BN en personas del grupo de enfermos con síndrome de down y una población de jóvenes saludables. De igual forma se reportó una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de CC, CL y CP en el grupo de personas con síndrome de down (Thomas et al. 2008).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del humo de soldadura en personas expuestas ocupacionalmente, mediante el ensayo Citómico en células exfoliadas del epitelio bucal.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Identificar el efecto citotóxico en el grupo expuesto al humo de soldadura y en el grupo referente (no expuesto) mediante la frecuencia de anomalías nucleares (Células con cromatina condensada, células carioréticas, células picnóticas y células cariolíticas), en células exfoliadas del epitelio bucal.

Evaluar el efecto genotóxico en el grupo expuesto al humo de soldadura y en el grupo referente (no expuesto) mediante la frecuencia de anomalías nucleares (Células con micronúcleos, células con brotes nucleares y células binucleadas), en células exfoliadas del epitelio bucal.

Asociar las frecuencias de anomalías nucleares con la edad de los individuos del grupo expuesto y el grupo referente (no expuesto) y el tiempo (años) de exposición al humo de soldadura.

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio epidemiológico observacional, analítico de tipo corte transversal, en un grupo de individuos expuestos ocupacionalmente al humo de soldadura y un grupo de individuos referentes (no expuestos), en la ciudad de Popayán.

6.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio conformado por un grupo de soldadores del sector informal de la ciudad de Popayán, expuestos ocupacionalmente al humo de soldadura.

6.3 HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en el presente estudio fue: Si la exposición al humo de la soldadura causa efectos citotóxicos o genotóxicos, se espera observar en células exfoliadas del epitelio bucal un incremento en la frecuencia de anomalías nucleares en el grupo expuesto con relación al grupo referente (H_1); de lo contrario la frecuencia de anomalías nucleares en personas expuestas ocupacionalmente y el grupo referente no presentarán diferencia significativa (H_0).

6.4 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO

Luego de identificar el problema, se definieron y clasificaron las variables (ver tabla 1) para plantear los objetivos de esta investigación

Tabla 1. Clasificación de las variables de estudio.

Variable	Tipo de Variable	Naturaleza	Nivel de Medición	Valores Categorías
Grupo de estudio	Independiente	Cualitativa	Nominal	Referente = 0 Expuesto = 1
Tiempo de exposición	Independiente	Cuantitativa	Razón Continua	Años
Edad (en años)	Independiente	Cuantitativa	Razón	Años
Índice de masa corporal	Independiente	Cuantitativa	Razón	Índice de masa corporal
GENOTOXICOS				
Micronúcleos	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de células con Micronúcleos
Brotos Nucleares	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de Células con Brotos Nucleares
CITOTÓXICOS				
Células Picnóticas	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de Células Picnóticas
Células Carioréticas	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de Células Carioréticas
Células Cariolíticas	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de Células Cariolíticas
Células con cromatina condensada	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de Células con Cromatina Condensada
Células Binucleadas	Dependiente	Cuantitativa	Continua	N° de Células Binucleadas

6.5 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 (Ver Anexo A) mediante la cual se obtuvo información personal sobre el estado de salud, estilo de vida, peso y talla (índice de masa corporal) y antecedentes familiares y laborales de cada uno de ellos. De acuerdo con los datos obtenidos en la encuesta y según los criterios de inclusión y exclusión, se conformó una muestra poblacional integrada por un grupo de 55 individuos expuestos al humo de soldadura, los cuales fueron emparejados por edad (± 2 años) con un grupo de 55 individuos referentes (no expuestos).

6.5.1 Criterios de inclusión y 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 hombres saludables con edad entre 18 -50 años, no haber recibido radiaciones (rayos X) en la cara o cuello durante los últimos tres meses antes de la toma de la muestra. Además, para los individuos que hicieron parte del grupo expuesto, tener un tiempo de exposición al humo de soldadura 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 químicos o radioterapia, y consumir algún tipo de medicamento citostático o sustancias psicoactivas. Asimismo, para los individuos que hicieron parte del grupo referente (no expuesto), haber estado expuesto al humo de soldadura en el lugar de trabajo.

6.6 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 advirtió sobre los posibles riesgos durante y después de la toma de la muestra. Luego de darles esta información los individuos firmaron el consentimiento informado voluntario (Ver Anexo B) para participar en el estudio, el cual cuenta con el aval del Comité de Ética (Ver Anexo C) para la investigación Científica de la Universidad del Cauca. 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).

6.7 ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL.

6.7.1 Toma de la muestra de células bucales de ambas mejillas. Después de la aplicación de la encuesta y la firma del consentimiento informado, a cada individuo del grupo expuesto y del grupo referente (no expuestos) se les realizó un frotis en forma circular con un cepillo citológico en la parte interna de la mejilla y posteriormente la muestra se depositó en tubos falcon de 15 mL que contenían 7mL de solución salina (0.9%).

6.7.2 Aislamiento de células bucales, obtención de las preparaciones citogenéticas y coloración. La muestra suspendida en solución salina se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 r.p.m. se extrajo el sobrenadante, se

adicionó 5 mL de solución salina y 20 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Se repitió el procedimiento dos veces más y finalmente cuando se obtuvo el pellet se añadió 1 mL de solución fijadora (metanol 80%), se resuspendió y se continuó con el extendido de la suspensión en un portaobjetos previamente limpiado con etanol y ácido acético (3:1). Para cada individuo se realizaron dos replicas de las preparaciones citogenéticas en portaobjetos. Luego se dejaron secar al aire y se fijó nuevamente con metanol al 80% durante 20 minutos. Después de un buen secado se procedió a la tinción de Feulgen con contratinción de Fast green (tinción diferencial o específica para el ADN) de las placas la cual da un contraste claro entre el material nuclear teñido de fucsia y el citoplasma teñido de color verde manzana, lo cual es requerido para hacer una fácil y correcta observación las anomalías nucleares (Thomas et al., 2009).

6.7.3 Registro de anomalías nucleares indicadoras de efecto citotóxico. Para el análisis de las preparaciones citogenéticas y registro de las anomalías nucleares de tipo citotóxico se tuvo en cuenta los criterios establecidos por Tolbert et al. (1992). Se realizó el análisis en 1000 células exfoliadas del epitelio bucal y se registraron las células con cromatina condensada (CC) (células que presentan un núcleo estriado, levemente fragmentado con una tenue coloración fucsia), células picnóticas (CP) (células que presentan un núcleo compacto pequeño y de una coloración mucho más intensa que los demás núcleos), células carioréticas (CR) (células que presentan un núcleo poroso con poca coloración), células cariolíticas (CL) (células que no presentan material nuclear y no tienen tinción fucsia sino una coloración verde manzana) y células binucleadas (BN) (células que contienen dos núcleos del mismo tamaño los cuales presentan la misma intensidad de coloración y se encuentran ligeramente separados) .

6.7.4 Registro de anomalías nucleares indicadoras de efecto genotóxico. Para el análisis de las preparaciones citogenéticas y el registro de las anomalías nucleares de tipo genotóxico se tuvo en cuenta los criterios establecidos por Tolbert et al. (1992). Se realizó el análisis en 2000 células exfoliadas del epitelio bucal y se registraron las células con micronúcleos (MN) (células con presencia de pequeños núcleos que no deben sobrepasar en tamaño la tercera parte del núcleo principal, el MN debe ser redondo u ovalado, y presentar un sólo tono de coloración en el mismo campo focal) y células con brotes nucleares (BN) (células que presentan un núcleo definido con un brote o un núcleo más pequeño conectados entre si, el brote debe tener la misma coloración y estar en mismo campo focal).

6.8 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos a partir de las encuestas fueron digitados en un formato Excel, para un posterior análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 11.5 (Statistical Package for the Social Scienses). El nivel de significancia se estableció

con un valor de $p < 0.05$. En este estudio la unidad de muestreo fue el individuo. Se aplicó la prueba de Kolmogoróv-Smirnov para determinar si los datos de las frecuencias de las anomalías nucleares se ajustaban a una 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 relación entre la variable exposición, el daño genómico y la muerte celular. Las medidas de resumen empleadas para reportar los datos fueron el promedio 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 promedio. Luego se empleó la prueba t de Student para comparar el grupo expuesto con el grupo referente (no expuesto), de acuerdo con la edad y el índice de masa corporal. Finalmente, se determinó la asociación entre los parámetros de daño genómico (MN y BE), muerte celular (CC, PC; CR CL y BN) y las variables cuantitativas como edad (años) y tiempo de exposición (años) de los individuos expuestos, mediante la prueba de correlación de Spearman. Como los resultados fueron significativos para los efectos citotóxicos se realizó un análisis de regresión para obtener el tipo de correlación entre estas variables. Para calcular la relación entre las anomalías nucleares y la variable cualitativa consumo de alcohol de la muestra poblacional se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En la Tabla 2 se reportan las características demográficas de la población objeto de estudio. La población estuvo integrada por 110 hombres sanos de la ciudad de Popayán, el grupo expuesto conformado por 55 individuos expuestos ocupacionalmente al humo de soldadura, y el grupo referente integrado por 55 individuos no expuestos laboralmente al humo de soldadura. Los resultados muestran que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre el promedio de edad del grupo expuesto con relación al promedio de edad del grupo referente. Los individuos estuvieron expuestos al humo de soldadura por un tiempo promedio de 15.60 ± 1.30 años con un rango entre 5 a 39 años, de igual forma manifestaron no usar equipos de protección personal (EPPs) como máscaras para gases, traje y guantes.

También se registró la posible influencia de otras variables en la frecuencia de anomalías nucleares, con relación al índice de masa corporal de ambos grupos de estudio, se observó que no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en el promedio del índice de masa corporal del grupo expuesto comparado con el promedio del índice de masa corporal del grupo referente (no expuesto). En cuanto al consumo de alcohol no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre el grupo expuesto y el grupo referente (no expuesto). En el grupo expuesto se obtuvo que el 52.7% de los individuos son consumidores de alcohol y el 47.3% no consumidores, en el grupo referente (no expuesto) el 38.2% de los individuos son consumidores de alcohol y el 61.8% no consumidores.

Tabla 2. Características demográficas de la población objeto de estudio, grupo referente (no expuesto) y grupo expuesto al humo de soldadura.

Características	Grupo referente (n = 55)	Grupo expuesto (n = 55)	P
Edad (años, promedio ± EE)	37.09 ± 1.34	37.13 ± 1.35	0.985 ^a
Tiempo de exposición (años, promedio ± EE)	-	15.60 ± 1.30	
Talla (Promedio ± EE)	171.07 ± 0.98	168.60 ± 1.07	
Peso (Promedio ± EE)	75.47 ± 1.34	70.78 ± 1.50	
Índice de masa corporal (IMC) (IMC = Peso / talla²) (Promedio ± EE)	25.80 ± 0.44	24.86 ± 0.44	0.137 ^a
Consumo de alcohol, n (%)			
No consumidores	34 (61.8)	26 (47.3)	
Consumidores	21 (38.2)	29 (52.7)	0.126 ^b

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

a. Mediante la prueba "t de Student".

b. Mediante la prueba de "Chi cuadrado".

7.2 EFECTO CITOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL AL HUMO DE SOLDADURA

En la Tabla 3 se muestra el efecto citotóxico identificado a través del valor promedio de la frecuencia de células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (CP), células carioréticas (CR), células cariolíticas (CL) y células binucleadas (BN) registradas y reportadas en 1000 células por individuo, según los criterios establecidos por Tolbert et al. (1992). Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre el valor promedio de la frecuencia de CC en el grupo expuesto comparado con el grupo referente (no expuesto). Además se registró un incremento estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre el valor promedio de la frecuencia de CP, CR y CL en el grupo expuesto comparado con el grupo referente (no expuesto). Para el valor promedio de la frecuencia de BN se observó una disminución pero esta no fue estadísticamente significativa. Las diferentes anomalías encontradas en ambos grupos de estudio se pueden apreciar en la figura 2.

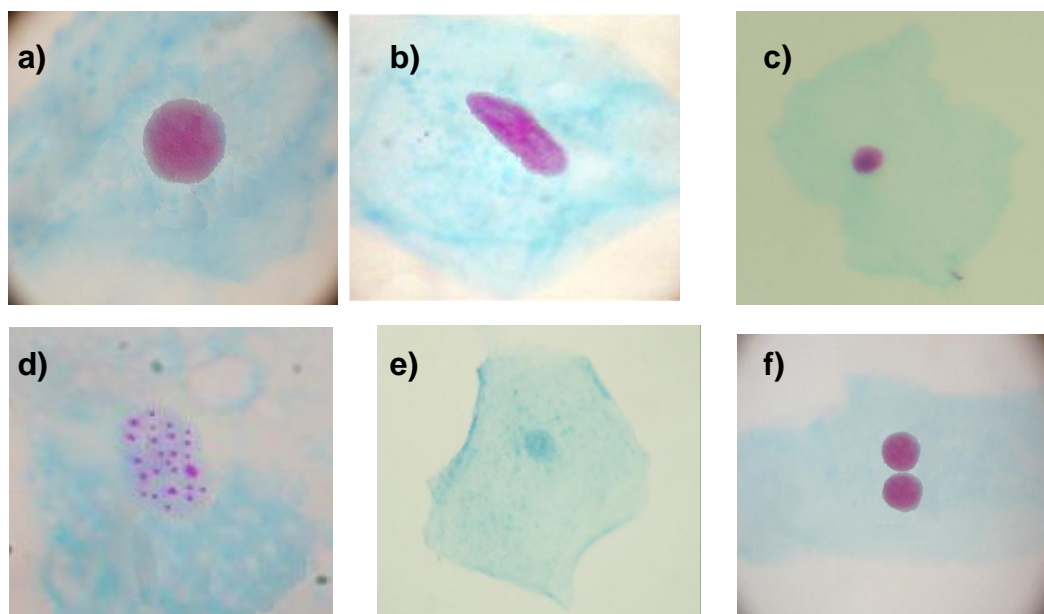
Tabla 3. Valores promedios de la frecuencia de células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (CP), células carioréticas (CR) y células cariolíticas (CL), en células exfoliadas del epitelio bucal de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto al humo de soldadura

Grupo	<i>n</i>	CC	CP	CR	CL	BN
Referente	55	18.85 ± 1.45	2.35 ± 0.56	7.38 ± 1.03	7.02 ± 0.99	2.56 ± 0.44
Expuesto	55	11.96 ± 0.66	5.35 ± 0.54	20.22 ± 1.36	14.09 ± 0.811	1.51 ± 0.28
<i>p</i>		<0.001 ^a	<0.001 ^a	<0.001 ^a	<0.001 ^a	0.096

Los valores son expresados como promedio ± Error Estándar.

a. Significancia estadística mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 2. Células exfoliadas del epitelio bucal con anomalías nucleares indicadoras de daño citotóxico. Tinción de Feulgen Fast green (1000x)



a) Célula diferenciada b) Célula con cromatina condensada; c) Célula picnótica d) Célula cariorética; e) Célula cariolítica. f) Célula binucleada

7.3 EFECTO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL AL HUMO DE SOLDADURA

En la Tabla 4 se muestra el efecto genotóxico identificado a través del valor promedio de la frecuencia de células con micronúcleos (MN) (Solo se encontró un micronúcleo por célula) y células con un brote nuclear (BE) registrados en 2000 células y reportadas en 1000 células por individuo, tanto para el grupo expuesto como para el grupo referente (no expuesto) según los criterios establecidos por Tolbert et al. (1992). Los resultados muestran que hay un aumento

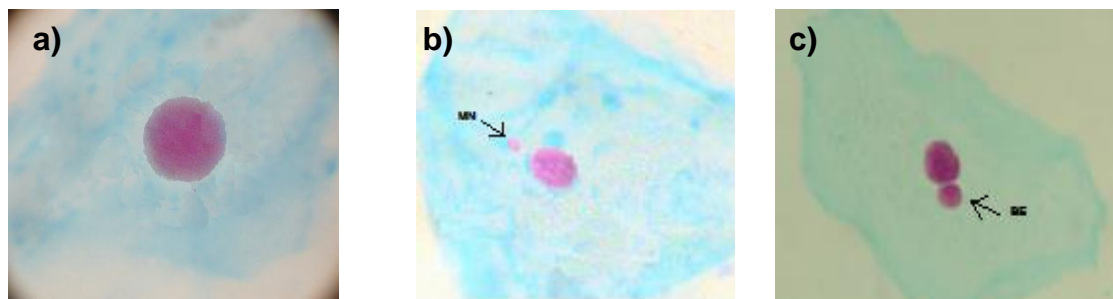
estadísticamente no significativo ($p > 0.05$) entre el valor promedio de la frecuencia de MN y BE del grupo de individuos expuestos al humo de soldadura y el valor promedio estimado para el grupo referente (no expuesto). Las diferentes anomalías de daño genotóxico (MN y BE) encontradas en ambos grupos de estudio se pueden apreciar en la figura 3.

Tabla 4. Valores promedios de la frecuencia de células con micronúcleos (MN) y células con brotes nucleares (BE), en células exfoliadas del epitelio bucal de individuos del grupo referente (no expuesto) y del grupo expuesto al humo de soldadura

Grupo	N	MN	BE
Referente	55	0.18 ± 0.05	0.38 ± 0.12
Expuesto	55	0.38 ± 0.09	0.40 ± 0.14
<i>P</i>		0.104 ^a	0.837 ^a

Los valores son expresados como promedio ± Error Estándar.
a. Significancia estadística mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 3. Células exfoliadas del epitelio bucal con anomalías nucleares indicadoras de daño genotóxico. Tinción de Feulgen fast green (1000x)



a) Célula normal diferenciada b) Célula con micronúcleo; c) Célula con brote nuclear

7.4 ASOCIACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES DEL ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL, EN LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.

En el tabla 5 se presenta la asociación entre los biomarcadores (citotóxicos y genotóxicos) del ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal por medio de la correlación de Spearman. La frecuencia de células con cromatina condensada (CC) mostró una correlación negativa con la frecuencia de células cariolíticas (CL) ($R^2 = - 0.501$, $p < 0.001$) y correlaciones positivas con la frecuencia

de micronúcleos (MN) ($R^2=0.268$, $p<0.005$) y brotes nucleares (BE) ($R^2=0.197$, $p<0.039$). Para las células carioréticas (CR) se observó una correlación positiva con las frecuencias de células picnóticas (CP) ($R^2=0.194$, $p<0.042$) y células cariolíticas (CL) ($R^2=0.346$, $p<0.001$) y una correlación negativa para la frecuencia de células binucleadas (BN) ($R^2= -0.201$, $p<0.036$). El biomarcador de BN mostró una correlación positiva con la frecuencia de células con brotes nucleares (BE) ($R^2=0.358$, $p<0.001$). Por último el biomarcador de MN también mostró una correlación positiva con la frecuencia de brotes nucleares (BE), ($R^2= 0.262$, $p< 0.006$).

Tabla 5. Correlación entre los biomarcadores del ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal para la población objeto de estudio.

CORRELACIÓN DE SPEARMAN		CC	CR	CP	CL	BN	MN	BE
CC	R^2	1						
	P							
CR	R^2	-0.039	1					
	P	0,685						
CP	R^2	-0.140	0.194	1				
	P	0.145-	0.042					
CL	R^2	-0.501	0.346	0.104	1			
	P	0.001	0.001	0.280				
BN	R^2	0.145	-0.201	-0.135	-0.026	1		
	P	0.131	0.036	0.161	0.791			
MN	R^2	0.268	0.136	0.065	0.039	0.042	1	
	P	0.005	0.157	0.498	0.682	0.660		
BE	R^2	0.197	0.012	-0.021	0.050	0.358	0.262	1
	P	0.039	0.898	0.829	0.605	0.001	0.006	

NS: No se encontró diferencia estadísticamente significativa

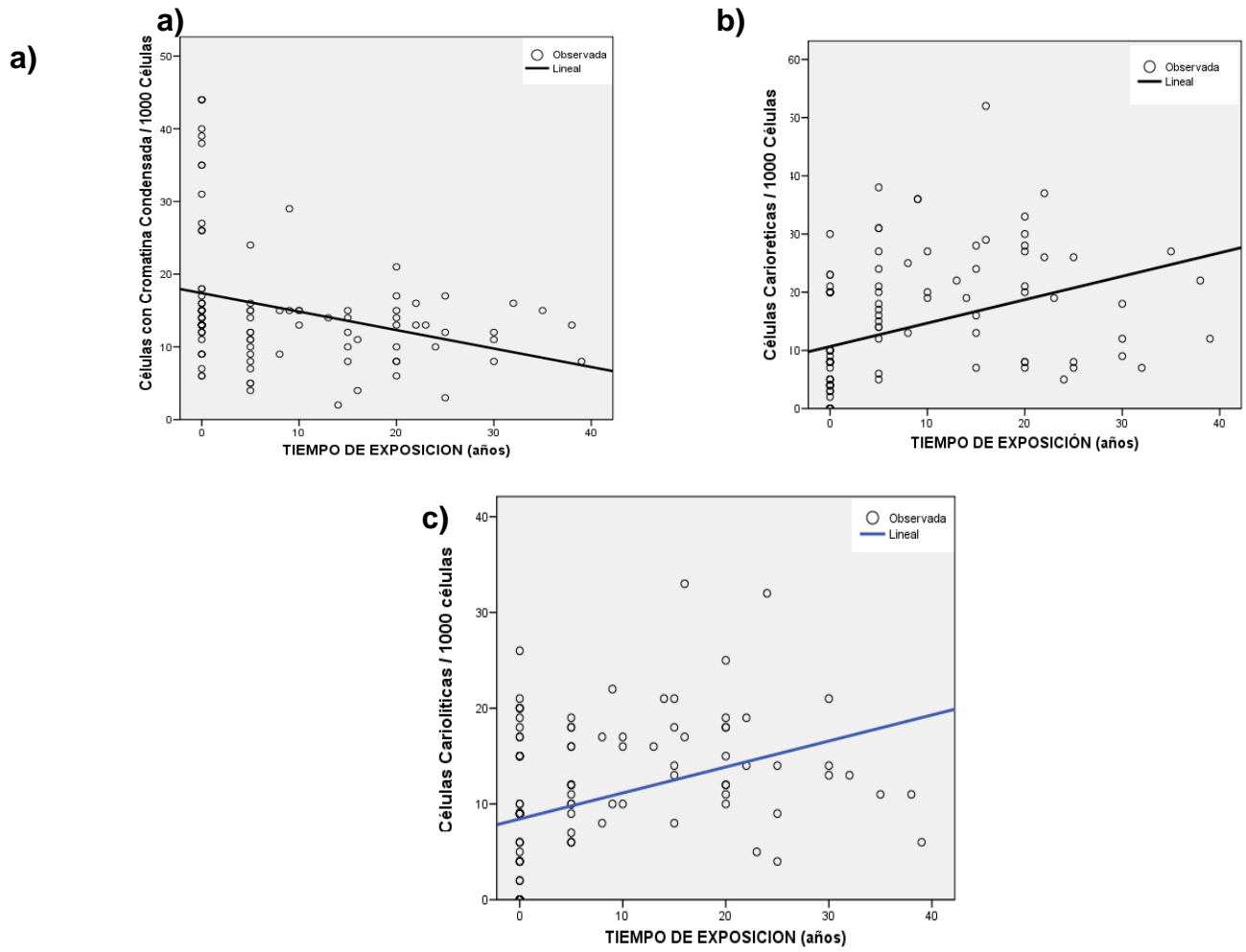
CC: células con cromatina condensada, CR: células carioréticas, CP: células picnóticas, CL: células cariolíticas y BN: células binucleadas

7.5 ASOCIACIÓN ENTRE EL EFECTO CITOTÓXICO. LA EDAD, EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN, EL CONSUMO DE ALCOHOL Y EL INDICE DE MASA CORPORAL.

Con relación a la variable edad (años), no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$; correlación de Spearman) con la frecuencia de anomalías nucleares indicadoras de efecto citotóxico (CC, CP, CR, CL y BN). Con relación al tiempo de exposición al humo de soldadura se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$; correlación de Spearman) con la frecuencia de anomalías como CC, CP CR y CL, excepto para BN. Al

realizar un análisis de regresión se obtuvo que hay una asociación lineal positiva (ver figuras 4b y 4c) entre la variable tiempo de exposición y la frecuencia de anomalías nucleares como CR y CL y una asociación lineal negativa (ver figura 4a) entre la variable tiempo de exposición y la frecuencia de CC. También al realizarse este mismo análisis (regresión) para las CP se obtuvo una asociación curvilínea, tipo cuadrática (ver figura 5) con el tiempo de exposición. El coeficiente de determinación permite inferir que la variabilidad de CC depende del tiempo de exposición en un 8.5%. Así mismo la variabilidad de CR, CL y CP depende del tiempo de exposición en un 14.4%, 13.8% y 62% respectivamente. De igual forma el consumo de alcohol no está asociado significativamente ($p > 0.05$; U de Mann - Whitney) con el efecto citotóxico entre los individuos tanto del grupo expuesto como del grupo referente (no expuesto) para todas las anomalías. Por otra parte para el índice de masa corporal no se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$; correlación de Spearman) con el efecto citotóxico.

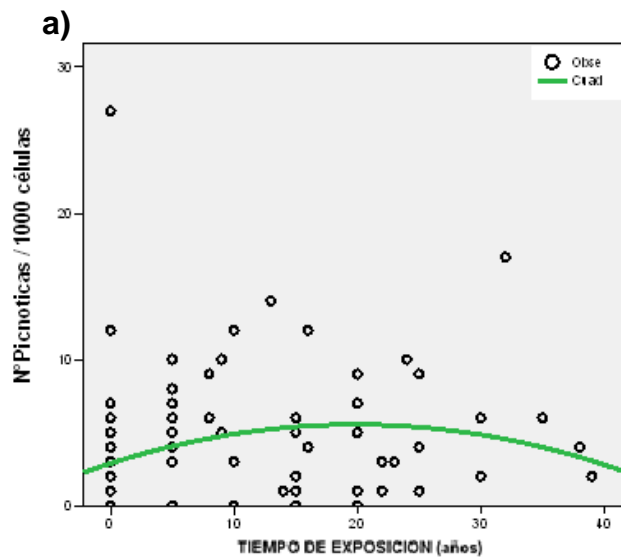
Figura 4. Asociación entre la frecuencia de células con cromatina condensada, células carioréticas, células cariolíticas con el tiempo de exposición.



a) Regresión lineal negativa entre la frecuencia de células con cromatina condensada y tiempo de exposición. b) Regresión lineal positiva entre la frecuencia de células carioréticas y tiempo de exposición. c) Regresión lineal positiva entre la frecuencia de células cariolíticas y tiempo de exposición.

Para las células con cromatina condensada se observó que a mayor tiempo de exposición disminuyó la frecuencia de este tipo de anomalía. Al observar las células carioréticas y cariolíticas es evidente que el incremento de la frecuencia de estas dos anomalías es proporcional al tiempo de exposición.

Figura 5. Asociación entre la frecuencia de células picnóticas con el tiempo de exposición.



a) Regresión cuadrática entre la frecuencia de células picnóticas y tiempo de exposición.

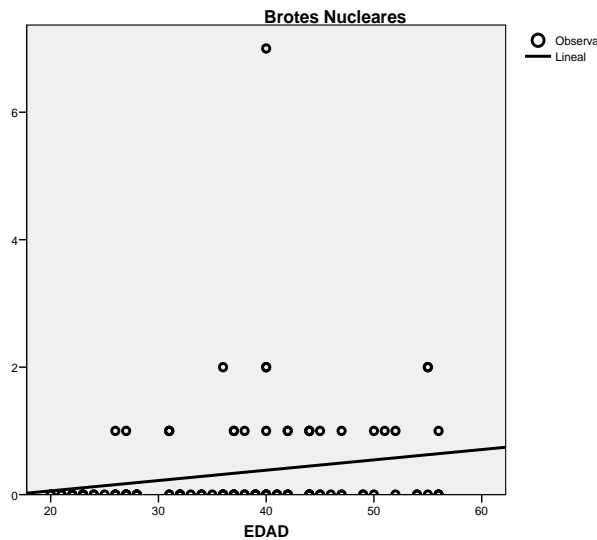
En este tipo de asociación se observa un incremento al inicio de tiempo de la exposición y muestra una mayor frecuencia a un tiempo de 20 y disminuye a mayor tiempo.

7.6 ASOCIACIÓN ENTRE EL EFECTO GENOTÓXICO, LA EDAD, EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN, EL CONSUMO DE ALCOHOL Y EL INDICE DE MASA CORPORAL

Con relación a la variable edad no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$; correlación de Spearman) de esta variable con la frecuencia de micronúcleos (MN). Se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$; correlación de Spearman) entre la edad y la frecuencia de células con brotes nucleares (BE) (ver figura 6). Al realizar un análisis de regresión se

determinó que la frecuencia de BE tiene una asociación lineal positiva con la variable edad. El coeficiente de determinación permite inferir que la variabilidad de BE depende en un 37% de la edad de los individuos. Con relación al tiempo de exposición al humo de soldadura, no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$; correlación de Spearman) de esta variable con ninguna de las frecuencia de anomalías como MN y BE. De igual forma el consumo de alcohol no está asociado significativamente ($p > 0.05$) (U de Mann – Whitney) con el efecto genotóxico (MN y BE) en los individuos tanto del grupo expuesto como del grupo referente (no expuesto). Por otra parte para el índice de masa corporal no se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$; correlación de Spearman) con el efecto genotóxico.

Figura 6. Asociación entre la frecuencia de células con brotes nucleares y la edad.



a) Asociación lineal entre la frecuencia de células con brotes nucleares y la edad.

El análisis de regresión permitió determinar que la frecuencia de BE se incrementa de forma proporcional con la edad (años).

8. DISCUSIÓN

La exposición al humo de soldadura es una problemática a nivel regional, nacional e internacional por el gran número de personas que trabajan como soldadores y no utilizan EPPs (equipos de protección personal), lo cual facilita el ingreso al organismo de los compuestos presentes en el humo de la soldadura, de los que se conocen efectos tóxicos, genotóxicos, mutágenicos inclusive cancerígenos (Costa et al., 1993). Sin embargo para la IARC (1990) aún, “no existe suficiente evidencia” de carcinogenesis en humanos por exposición ocupacional como soldador y clasifica al humo de soldadura como posible carcinógeno (grupo 2B). Luego es evidente la necesidad de realizar estudios como este para conocer con más detalle el efecto de la exposición al humo de soldadura

Teniendo en cuenta los pocos estudios que se han realizado sobre los efectos citotóxicos y genotóxicos de este “posible agente cancerígeno”, los nuevos estudios sobre poblaciones expuestas al humo de soldadura deben utilizar marcadores, pruebas y sistemas biológicos que permitan obtener mayor información y de esta forma llenar la brecha de conocimiento que se tienen sobre los efectos por la exposición ocupacional al humo de soldadura. Por tal motivo en este estudio se empleo el ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal debido a que permite evaluar exposiciones agudas o crónicas a agentes citotóxicos / genotóxicos como el humo de la soldadura (Tomas et al., 2009) y posiblemente con la caracterización de los efectos de esta exposición, en un futuro se podrán predecir los posibles riesgos que tiene la población de soldadores de desarrollar enfermedades de origen ocupacional por inhalación del humo de soldadura.

Hasta el momento los estudios reportados que evalúan la exposición al humo de soldadura, que han empleado biomarcadores del ensayo citómico, no utilizan tinciones diferenciales o específicas para el ADN como lo son la tinción de Feulgen, tinción con naranja de acridina, DAPI entre otras (Tejedor, 2011; Odio et al., 2005). Con la tinción no diferencial ni específica para ADN (Tinción de giemsa) utilizada por esos estudios, por lo general se tiñen gránulos de queratohialina estructuras comúnmente encontradas en células bucales que son ricos en proteína (Thomas et al., 2009), de manera que al emplear ese tipo de tinción se corre el riesgo de realizar un registro y reporte de falsos positivos de los biomarcadores, por ejemplo se puede confundir un micronúcleo con un gránulo de queratohialina. A diferencia de esa tinción, en este estudio se empleó una tinción diferencial y específica para el ADN, la tinción de Feulgen-Fast green (Bonassi et al., 2011). Luego, los resultados obtenidos en este estudio son más confiables porque eliminan la posibilidad de tomar falsos positivos en el momento del registro de las anomalías nucleares como puede suceder con otros estudios que utilizan tinciones no específicas para el ADN

Otra ventaja de este estudio es el empleo de una población expuesta ocupacionalmente al humo de soldadura de 55 individuos apareados con el mismo número de referentes (no expuestos), este número de individuos es superior al tamaño poblacional utilizados por otros estudios en poblaciones expuestas al humo de soldadura que utilizan biomarcadores del ensayo citómico en células exfoliadas como el de Odio et al. 2005 (11 Expuestos / 11 Referentes) y el de Tejedor et al. 2011 (36 Expuestos / 25 Referentes). En este estudio solo se utilizó una población masculina a diferencia de la investigación realizada por Danadevi et al 2004 que emplearon individuos de ambos géneros y hasta el momento no se conoce bien como la variable genero afecta la frecuencia de anomalías nucleares de las células exfoliadas del epitelio bucal (Bonassi et la., 2011). Otra característica de este estudio es que se realizó un emparejamiento por edad de los individuos del grupo expuesto con los del grupo referente con una diferencia de edad máxima de ± 2 años, para no tener sesgos en los resultados debido a que esta variable puede afectar la frecuencia de las anomalías nucleares del ensayo citómico. Luego, con las anteriores características los resultados de este estudio son más confiables, además, cabe resaltar que es la primera vez que en Colombia se emplea este ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal con todos sus biomarcadores, con tinción específica / diferencial para el ADN y con una población objeto de estudios de más de 100 individuos en el biomonitoreo genético en una población expuesta ocupacionalmente al humo de soldadura.

Por otra parte el ensayo citómico (BMCyt) es una prueba mejorada del ensayo de MN en células exfoliadas del epitelio bucal, debido a que el BMCyt reúne el análisis de siete anomalías nucleares que identifican efectos citotóxicos como células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (CP), células carioréticas (CR), células cariolíticas (CL) y células binucleadas (BN) y efectos genotóxicos como micronúcleos(MN) y brotes nucleares (BE), característica que hace que este ensayo sea de gran utilidad para la aplicación en poblaciones expuestas a agentes tóxicos porque permite entender cómo un agente químico o mezclas de agentes químicos afectan la dinámica celular y produce un incremento de anomalías nucleares en las células del tejido epitelial. Por tal razón el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del humo de soldadura en personas expuestas ocupacionalmente, mediante el ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal y de esta forma relacionar el incremento de anomalías nucleares con un posible riesgo de desarrollar enfermedades de origen ocupacional.

Este estudio permitió obtener las frecuencias de los biomarcadores del grupo referente los cuales son frecuencias basales o frecuencias espontáneas de daño en la célula y el ADN (no expuestas a ningún agente químico) para cada uno de los diferentes biomarcadores del ensayo citómico. Estos datos permiten realizar varias comparaciones con otros estudios reportados de diferentes laboratorios y de esta manera poder establecer intervalos sobre las frecuencias espontáneas de los diferentes daños citotóxicos y genotóxicos que se pueden encontrar en las

células exfoliadas del epitelio bucal sin ningún tipo de exposición a agentes químicos. Luego las frecuencias obtenidas en este estudio son un aporte más para el consorcio del HUMN_{XL} el cual recopila toda la información reportada acerca del ensayo citómico.

En el registro de la frecuencia basal de anomalías nucleares que identifican un efecto citotóxico se registró que el valor promedio de la frecuencia basal de células con cromatina condensada fue de 18.85 ± 1.45 . Así mismo para la frecuencia de células picnóticas (CP), células carioréticas (CR), células cariolíticas (CL) y células binucleadas (BN) el valor promedio de la frecuencia basal fue de 2.35 ± 0.56 , 7.38 ± 1.03 , 7.02 ± 0.99 y 2.56 ± 0.44 respectivamente. De igual forma para los biomarcadores de genotoxicidad como micronúcleos (MN) y brotes nucleares (BE) se obtuvo un valor promedio de la frecuencia basal fue de 0.18 ± 0.05 y 0.38 ± 0.12 respectivamente. Estos resultados obtenidos pueden ser comparados con los reportados en el meta análisis realizado por Bonassi et al. (2011) que reporta los valores promedio para las frecuencias basales de 4.38 ± 0.52 para células picnóticas, de 2.23 ± 0.25 para células carioréticas, de 3.04 ± 0.20 para células binucleadas, de 1.36 ± 0.08 para brotes nucleares y se estableció un rango de 0 – 1.7 para micronúcleos (MN). Al contrastar estos valores con los de este estudio se observa que los valores reportados por Bonassi et al. (2011) son mayores para el caso de CP, BN, MN y BE y menores para CR, esto puede ser debido a que todas las frecuencias obtenidas en el meta análisis son de diferentes estudios realizados por diversos laboratorios alrededor del mundo y por lo tanto los estudios varían respecto a la metodología de toma de muestra, procesamiento de las muestras del epitelio bucal, el número de personas que registran los biomarcadores, factores individuales como etnia y en muchos casos no utilizan tinciones específicas y diferenciales para el ADN, factores que pueden influenciar en el registro de la frecuencia de las diferentes anomalías nucleares e incrementar las frecuencias basales (Ceppi et al. 2010; Thomas et al. 2009). Adicional a esto, en el meta análisis no se incluyen poblaciones colombianas. Luego los resultados obtenidos en este estudio son un gran aporte al consorcio de HUMN_{XL} por la nueva información acerca de la tendencia de las frecuencias basales en una población colombiana.

Las frecuencias basales obtenidas en esta investigación también se pueden comparar con otros estudios que emplean anomalías nucleares en células exfoliadas para evaluar diferentes exposiciones. Estos resultados son similares con los valores promedio de frecuencias basales de varias anomalías reportadas por otros estudios, por ejemplo el valor promedio de la frecuencia basal de células con cromatina condensada (CC) observadas en éste estudio 18.85 ± 1.45 es similar al valor promedio de la frecuencia basal de 22.5 ± 11.47 reportada por el estudio del protocolo del ensayo citómico realizado por Thomas et al. (2009). Para el caso del valor promedio de la frecuencia basal de células carioréticas (CR) (7.38 ± 1.3), es similar al reportado por el estudio de Ranjan et al. (2005) que reporta 6.45 ± 0.76 . En cuanto al valor promedio de la frecuencia basal de las células

cariolíticas (CL) observada en este estudio (7.02 ± 0.99) se encontró que concuerdan con el valor reportado por Wultsch et al. (2013) y Benedetti et al. (2013) con valores como 5 y 9.7 ± 4.6 respectivamente. También se observó que para el valor promedio de la frecuencia basal de células picnóticas (CP) reportada en este estudio (2.35 ± 0.56) es coherente con la investigación realizada por Benedetti et al. (2013) quien reporta un valor promedio de la frecuencia de CP de 1.9 ± 2.6 . Así mismo para el valor promedio de la frecuencia basal de células binucleadas (BN) (2.56 ± 0.44) observadas en éste estudio se encontró que coincide con el valor reportado por Celik et al. (2013) de 2.55 ± 0.19 . De igual forma para las anomalías nucleares que expresan efectos genotóxicos, este estudio obtuvo un valor bajo para la frecuencia basal de MN (0.18 ± 0.05), valor similar a los resultados reportados por Gonzales-Yebra et al. (2009); Martins et al. (2009); Karahalil et al. (1999); Burgaz et al. (1999); Garcia et al. (2012) y Rohr et al. (2013) con valores promedio de frecuencias basales de micronúcleos reportadas así: 0.0, 0.04 ± 0.04 , 0.05 ± 0.04 , 0.08 ± 0.09 ; 0.2 y 0.21 ± 0.41 respectivamente. De igual forma, se tiene que el valor promedio de la frecuencia basal de brotes nucleares (BE) (0.38 ± 0.02) observada en este estudio es similar a la reportada por Celik et al. (2010) con una frecuencia de 0.31 ± 0.02 . Finalmente se observa que los resultados de este estudio son muy confiables debido a que todos los valores promedio de las frecuencias de anomalías nucleares son similares a las frecuencias reportadas en estudios de biomonitoreos en poblaciones expuestas a diferentes agentes citotóxicos y genotóxicos.

Además del reporte de los valores promedio de las frecuencias basales de las anomalías nucleares de una población colombiana este ensayo permitió analizar el efecto citotóxico y genotóxico inducido por la exposición ocupacional al humo de soldadura. El efecto citotóxico se obtuvo a partir del análisis y comparación de los valores promedio de las frecuencias de anomalías nucleares como células con cromatina condensada (CC), células picnóticas (CP), células carioréticas (CR) células cariolíticas (CL) y células binucleadas (BN) (Thomas et al., 2009) entre el grupo expuesto y el grupo referente (no expuesto). Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) del valor promedio de la frecuencia de células con CC en el grupo expuesto (11.96 ± 0.66) comparado con el grupo referente (no expuesto) (18.85 ± 1.45), lo cual puede ser explicado con la relación que tienen las CC consideradas como un evento temprano de muerte celular con la formación de otras anomalías nucleares identificadoras de efecto citotóxico y eventos tardíos de muerte celular. Al considerarse las CC como una posible etapa preformadora de otras anomalías es de esperar que las otras frecuencia de anomalías indicadoras de muerte celular como CR, CP y CL (considerada como posibles eventos posteriores al estadio de CC) muestren un comportamiento inversamente proporcional a la frecuencia de CC debido a que se reportó que en algunos casos estas frecuencias se incrementaron hasta 3 veces el valor promedio de la frecuencia de las anomalías en el grupo expuesto con relación al grupo referente. Por otro lado para las otras anomalías nucleares como CP, CR y CL como se menciona anteriormente, se observó un incremento

estadísticamente significativo ($p < 0.001$) del valor promedio de las frecuencias del grupo expuesto con relación a las del grupo referente (no expuesto) y no se encontró una diferencia estadísticamente significativo ($p = 0.096$) en el valor promedio de la frecuencia de células binucleadas (BN) del grupo expuesto en comparación con el valor promedio de las frecuencias del grupo referente (no expuesto). Para el estudio en soldadores realizado por Odio et al. (2005) y tejedor (2011) se reporta un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) de células binucleadas comparando el grupo expuesto y el grupo referente, pero en estos estudios la población es inferior a 50 individuos y no incluyen en los criterios de exclusión el consumo de cigarrillo, un factor importante para poder determinar el efecto real de la exposición ocupacional al humo de soldadura. Según los resultados obtenidos en este estudio se podría decir que los compuestos que hacen parte del humo de la soldadura no están induciendo efectos sobre la citocinesis produciendo una menor frecuencia de células binucleadas en las células exfoliadas del epitelio bucal del grupo expuesto, pero si están produciendo directamente al interior celular una respuesta apoptótica o también se podría decir que el incremento de los biomarcadores de eventos tempranos (CC) y tardíos (CR y CL) de apoptosis e indicadores de algún tipo de muerte celular (CP) pueden ser una respuesta celular a la expresión de lesiones primarias o daños irreparables ocasionado por los compuestos del humo de soldadura como los metales pesados.

Algunos metales componentes del humo de la soldadura pueden imitar metales esenciales y así consiguen acceder a macromoléculas blanco. Es evidente que los metales interactúan con enzimas y activan e inactivan procesos celulares muchas veces controlados por metales esenciales (Ellen and Silbergeld 2000). De igual forma los metales podrían interactuar con diferentes enzimas o desplazar metales cofactores esenciales y así producir en las células respuestas apoptóticas debido a que muchos de estos metales alteran la proliferación celular incluyendo desórdenes en la apoptosis. Así mismo los metales pueden alterar la estructura y función de un número de orgánulos. Por ejemplo, pueden inhibir enzimas asociadas con el retículo endoplásmico y la mitocondria y de esta forma llevar a las células por la vía apoptótica con el fin de eliminar el daño. Luego, la presencia de metales pesados en el entorno de trabajo de los soldadores es un inminente riesgo debido a todos los procesos celulares en los que éstos podrían interactuar y resultar nocivos para la célula y en diferentes ocasiones el incremento de la respuesta apoptótica inducida por los metales puede resultar en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el exceso de apoptosis como enfermedades neurodegenerativas en los individuos expuestos a metales pesados presentes en el humo de la soldadura (Lev et al., 2003)

Esencialmente la apoptosis ocurre cuando el daño celular, incluyendo el daño en el ADN, ha excedido la capacidad de reparación de la célula. Los metales pueden afectar la apoptosis y la supresión de la respuesta apoptótica, facilitando la acumulación de células con daños que pueden ser un paso crítico inicial en el

desarrollo de neoplasias malignas o autoinmunidad. Luego los metales presentes en el humo de soldadura pueden estar afectando diferentes procesos al interior celular que están llevando a la células exfoliadas del epitelio bucal por vías apoptóticas o bien la apoptosis puede ser una respuesta a la eliminación de daño irreparable en el ADN al interior celular, producidos en este caso por la exposición ocupacional al humo de soldadura. Según los resultados obtenidos en este estudio se encontró un incremento en los marcadores de citotoxicidad (CR, CP y CL) resultado que muestran que los metales pesados presentes en el humo de la soldadura producen una respuesta apoptótica en las células exfoliadas del epitelio bucal. De igual forma la aparición de este tipo de anomalías podría indicarnos que la exposición al humo de soldadura podría estar afectando también otro tipo de tejidos epiteliales como el tracto superior del sistema respiratorio el cual está en contacto con el tejido epitelial de la cavidad oral que es la primera barrera al contacto de el humo de soldadura en el momento del ingreso al organismo.

Del mismo modo para cumplir con el segundo objetivo de esta investigación se analizó el efecto genotóxico causado por la exposición ocupacional al humo de soldadura mediante el análisis del valor promedio de la frecuencia de micronúcleos y brotes nucleares. Al observar los resultados obtenidos fue evidente un incremento en la frecuencia de ambas anomalías en el grupo expuesto respecto al grupo referente. Sin embargo este incremento no fue estadísticamente significativo (micronúcleos, $p=0.14$; brotes nucleares, $p=0.837$). El incremento del efecto genotóxico por exposición al humo de soldadura aunque no fue estadísticamente significativo puede explicarse como un efecto producido por la interacción de los metales pesados con el ADN de las células exfoliadas del tejido epitelial, debido a que los metales producen efectos genotóxicos (Beyersmann et al 2008) por la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que producen estrés oxidativo al interior celular. El aumento de estrés oxidativo en el organismo se puede medir a través de biomarcadores de exposición como 8-hidroxi-2'deoxiguanosina. Existe un estudio en una población de soldadores que ha evaluado este biomarcador (8-hydroxy-2'deoxyguanosin) medido en la orina y reporta un incremento estadísticamente significativo en los individuos del grupo expuestos al humo de soldadura comparado con el grupo referente (no expuesto) (Nuernberg et al., 2008). Según los resultados de ese estudio hay aumento de estrés oxidativo en los soldadores y esto puede ser producido por el aumento de EROs causado por los metales pesados presentes en el humo de soldadura.

Otra posible explicación en la diferencias entre expuestos y referentes es la formación de aductos en el ADN por la afinidad nucleófila de los metales que al no ser reparados o ser mal reparados pueden ocasionar rupturas en una de las cadenas del ADN y rrupturas cromosómicas que conllevan a la formación de micronúcleos (MN) (Thomas et al., 2009), evidente en este estudio al compara el valor promedio de la frecuencia de MN del grupo expuesto (0.38 ± 0.02) con el grupo referente (0.18 ± 0.05). Luego los resultados de este estudio sugieren que aunque no hay un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de

anomalías indicadoras de efecto genotóxico, se puede decir que los metales pesados podrían estar induciendo efectos genotóxicos en las células exfoliadas del epitelio bucal y este efecto genotóxico a su vez puede estar relacionada con el aumento del efecto citotóxico en las células exfoliadas, debido a que uno de los mecanismos de eliminación de daños o lesiones primarias en el ADN que no son reparados correctamente la célula opta por eliminarlos por vía apoptótica. Siendo esta otra explicación al aumento significativo de biomarcadores indicadores de efecto citotóxico. Por otra parte se debe tener en cuenta que por el efecto genotóxico inducido por los metales pesados presentes en el humo de soldadura, la población expuesta corre el riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer debido a que las lesiones que puedan ocasionar las EROs o la formación de aductos al no ser o ser mal reparadas puedan expresarse como mutaciones lo cual es el paso inicial en el proceso cancerígeno (Vodicka et al., 2004)

Los resultados de este estudio no concuerdan con los resultados obtenidos por Danadevi et al. (2004) quienes encontraron un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN en células exfoliadas del epitelio bucal del grupo expuesto con respecto al grupo referente (no expuesto). El estudio de Tejedor (2011) aumentó otra anomalía nuclear que identifican daño genotóxico como brotes nucleares y considero a las células binucleadas como daño genotóxico también. En ese estudio se encontró un aumento estadísticamente significativo para BE y BN en el grupo expuesto comparado con el grupo referente. En cuanto al empleo de biomarcadores de genotoxicidad (MN y BE) y el empleo de marcadores de citotoxicidad analizados en células exfoliadas del epitelio bucal, sólo se encuentra un trabajo realizado en Cuba (Odio et al., 2005) que analiza micronúcleos, células binucleadas, células picnóticas, células con cromatina condensada y células cariolíticas en trabajadores expuestos al humo de soldadura. Este trabajo incluye un tamaño de muestra de 11 soldados. En cuanto a la reducida frecuencia de MN en células exfoliadas del epitelio bucal una posible explicación puede ser la eliminación del daño en el ADN, por la activación de procesos apoptóticos o de muerte celular evidente en este estudio por el incremento estadísticamente significativo de anomalías nucleares indicadoras de efecto citotóxico (CP, CR y CL).

A pesar del incremento no significativo de efecto genotóxico encontrado en este estudio, existe evidencia de efectos genotóxicos en diferentes biomonitoreos en poblaciones expuestas al humo de soldadura donde se emplean biomarcadores ya validados para predecir el riesgo de desarrollar cáncer como alteraciones Cromosómicas (AC) (Eliaset al. 1989, Knudsen et al. 1992, Jelmert et al. 1994a,1995b; Halasova et al. 2008) y micronúcleos en linfocitos en sangre periférica (Iarmarcovai et al., 2005a, 2006b) donde se reportan un aumento estadísticamente significativo de AC y MN en el grupo de soldados comparado con el grupo referente (no expuesto). Otro biomarcador de efecto genotóxico como intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) también muestra una diferencia estadísticamente significativa en el grupo expuesto comparado con el grupo

referente. Del mismo modo existen otros biomonitoreos realizados con el ensayo cometa, una prueba que al igual que micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal se encuentra en fase de validación para ser biomarcadores predictores del riesgo de desarrollar cáncer. En los dos estudios (Sardas et al. 2010; Zhu *et al.* 2001) realizados con el ensayo cometa se encontró un incremento estadísticamente significativo en el daño en el ADN (lesiones primarias) inducidas por la exposición al humo de soldadura las cuales pueden ser reparadas. Luego de observar los resultados obtenidos ($P < 0.05$) por otros estudio es evidente el efecto genotóxico de humo de soldadura, resultado que no fue evidente en este estudio por consiguiente es necesario realizar más estudios que permitan dilucidar el daño en el ADN o genotoxicidad del humo de soldadura

Al observar los resultados obtenidos en este estudio es evidente la diferencia entre la frecuencia de anomalías nucleares del grupo expuesto respecto al grupo referente. De acuerdo con lo anterior la hipótesis nula debe ser rechazada, y por lo contrario es aceptada la hipótesis alternativa, en la que se proponía que “si la exposición al humo de la soldadura causa efectos citotóxicos o genotóxicos, se espera observar en células exfoliadas del epitelio bucal un incremento en la frecuencia de anomalías nucleares en el grupo expuesto con relación al grupo referente”. El incremento en la frecuencia de las anomalías nucleares como células picnóticas (CP), células carioréticas (CR) y células cariolíticas (CL) en el grupo expuesto, indica un mayor efecto citotóxico en las células exfoliadas del epitelio bucal de los soldados comparado con el grupo referente (no expuesto), según ésto el incremento es atribuido a la exposición ocupacional al humo de soldadura, el cual es una compleja mezcla de metales pesados particulados y gases (Sriram et al., 2011) que se liberan rápidamente a la atmosfera y son inhalados y entran en contacto con la cavidad oral de los soldados que se encuentran totalmente expuestos debido a que no cuentan con equipos de protección respiratoria.

Este estudio también permitió realizar una correlación entre todos los biomarcadores empleados para obtener una posible relación entre la formación de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad. Se obtuvo una asociación positiva, estadísticamente significativa entre la frecuencia de micronúcleos (MN) y los brotes nucleares (BE) ($R^2=0.262$, $p=0.006$). Sin embargo no es posible comparar el comportamiento de la asociación entre MN y BE de este estudios con los resultados obtenidos en estudios publicados en otras poblaciones expuestas al humo de soldadura debido a que en los dos estudios que hasta el momento han sido reportados sobre la exposición ocupacional al humo de soldadura (Tejedor 2011; Odio et al.2005) no incluyen este tipo de análisis para correlacionar los biomarcadores. El resultado obtenido en este estudio podría mostrar una estrecha relación entre la formación de los MN y los BE. La formación de los MN ya es conocida, los BE están relacionados con la amplificación de genes, o con daños genotóxicos por compuestos químicos (Nersesyán 2005; Thomas et al. 2009). Del mismo modo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los

brotos nucleares (BE) y las células binucleadas (BN) ($R^2=0.358$, $p=0.001$) las cuales se cree que se forman debido a un bloqueo en la citocinesis producto de errores en el sistema de división celular o por exposición a químicos (Bonassi et al., 2011). Este biomarcador se lo ha relacionado con los daños acumulados que produce la exposición a químicos (Bonassi et al., 2011). Debido a los resultado de la correlación se podría decir que la formación de células binucleadas (BN) podría relacionarse con brotes nucleares (BE), pero no se podría afirmar esto debido a que los mecanismos de formación de ambas anomalías son muy diferentes.

Los micronúcleos (MN) también mostraron una correlación con las células con cromatina condensada (CC) ($R^2= 0.268$, $p=0.005$), de igual forma las (CC) tiene una asociación con el otro marcador de genotoxicidad, brotes nucleares (BE) ($R^2= 0.197$, $p=0.039$). Estos resultados muestran una posible relación entre los efectos genotóxicos atribuidos a la exposición ocupacional como soldador y la posible inducción de muerte celular en el tejido epitelial como consecuencia de lesiones celulares irreversibles (Rana 2008) y como mecanismo de eliminación de un daño que resulta en un incremento estadísticamente significativo de biomarcadores indicadores de efecto citotóxico. Los resultados de este estudio son similares a los reportados por el estudio de Çelik et al. (2010) donde se observa una correlación entre el aumento de células carioréticas y células cariолíticas y la disminución en la frecuencia de MN. Luego la exposición al humo de soldadura está afectando la frecuencia de anomalías indicadoras de efecto citotóxico y a su vez, éstas muestran una relación con los biomarcadores de efecto genotóxico. Lo anterior puede sugerir que el aumento de la frecuencia de marcadores de citotoxicidad puede ser una respuesta a los efectos genotóxicos por exposición a los metales pesados componentes del humo de soldadura.

De acuerdo con el análisis de correlación para los marcadores de citotoxicidad como las células con cromatina condensada de la cual se encontró una frecuencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio, y se observo una mayor frecuencia en el grupo referente comparado con el grupo expuesto, se obtuvo una asociación negativa con la frecuencia de células cariолíticas ($R^2= - 0.501$, $p=0.001$). Las células con cromatina condensada se cree que son un estadio temprano de apoptosis (Thomas et al., 2009) en cuanto a las células cariолíticas estas son consideradas como un estadio tardío de muerte celular. Al encontrar una asociación negativa esto indica que a menor cantidad de células con cromatina condensada vamos a encontrar una mayor cantidad de células cariолíticas, debido a que posiblemente existe una relación en el proceso de formación de estos biomarcadores. Siguiendo esta misma idea podría decirse que las células con cromatina condensada son predecesoras de las células cariолíticas y su comportamiento es inversamente proporcional. De igual forma las células cariолíticas mostraron una fuerte asociación ($R^2= 0.346$, $p=0.001$) con células carioréticas biomarcador considerado como una etapa temprana de apoptosis que a su vez ha sido relacionado como una etapa posterior a las células con cromatina condensada (Thomas et al., 2009). Por lo tanto después de analizar la información

obtenida se puede decir que las células con cromatina condensada pueden ser precursoras de las células carioréticas ya que ambas son estadios tempranos de apoptosis y que posiblemente las células carioréticas pueden ser precursoras de las células cariolíticas que son estadios tardíos de apoptosis. Por otra parte las células picnóticas, otro biomarcador de apoptosis sólo tuvo una correlación estadísticamente significativa con el biomarcador de células carioréticas ($R^2=0.194$, $p=0.042$), lo cual muestra una posible asociación en cuanto a la formación de estos dos biomarcadores. Sin embargo al no conocerse con exactitud los procesos de formación de las anomalías nucleares este estudio nos permite tener algunos acercamientos sobre la formación de estas anomalías, por lo tanto, es necesario seguir realizando estudios que den información que permita tener una mejor interpretación de la asociación y formación de cada una de las anomalías del ensayo citómico y de igual forma realizar más estudios que muestren los efectos de los diferentes compuestos como los metales presentes en el humo de la soldadura.

Según los resultados obtenidos en este estudio se puede decir que una vez los metales presentes en el humo de la soldadura interactúan con el ADN y provocan lesiones primarias, éstas al no ser reparadas o ser mal reparadas se puede iniciar en la célula eventos de muerte celular evidenciados a través del incremento de anomalías nucleares que pueden ser evidenciadas mediante la aplicación del ensayo citómico (células con cromatina condensada, células picnóticas, células carioréticas y células cariolíticas) (Çelik et al., 2013). Aunque es importante recordar que el proceso de apoptosis es fundamental para la renovación y es un proceso normal en la dinámica del tejido epitelial, en este estudio se observa un desequilibrio y aumento en la frecuencia de anomalías indicadoras de efecto citotóxico en personas expuestas al humo de soldadura al compararlos con la frecuencia de algunas anomalías indicadoras de efecto citotóxico del grupo referente (no expuesto) indicando que los componentes del humo de soldadura están interfiriendo en el normal funcionamiento del epitelio bucal, y al ser estos compuestos inorgánicos los resultados de la interacción con el organismo son inesperados como el desarrollo de diferentes enfermedades de origen ocupacional o en diferentes casos desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de parkinson una enfermedad relacionada con la exposición ocupacional al humo de soldadura (Sriram et al., 2011)

Finalmente los resultados obtenidos en este estudio lastimosamente al no poder ser comparados con varios estudios de poblaciones expuestas al humo de soldadura por la pocas investigaciones reportadas se puede comparar con otros estudios que han empleado el ensayo citómico. Se observa que los resultados del presente estudio concuerdan con otra investigación que reportan un incremento no significativo de anomalías indicadoras de efecto genotóxico y un incremento significativo en anomalías indicadoras de efecto citotóxico como la investigación de Wultsch et al. (2013) realizada en individuos expuestos a gases producto de estiércol de aves de corral. Por otra parte otros estudios muestran una frecuencia

significativa de MN y biomarcadores de citotoxicidad como los realizados por Benedetti et al. (2013) realizada en una población expuestas a plaguicidas y Rohr et al. (2013) en una población expuesta en minas de carbón. Sin embargo es importante resaltar que en los dos últimos estudios se empleó una tinción no diferencial ni específica para el ADN (tinción de giemsa) explicando la posible causa del aumento en la frecuencia de micronúcleos. Luego, al observar que los resultados de este estudio son similares a los de otros estudios que evalúan exposiciones ocupacionales y aplican el ensayo citómico, es correcto afirmar que la utilización de este prueba en células exfoliadas del epitelio bucal es sensible y útil para evaluar diferentes tipo de exposición porque permite analizar el efecto citotóxico y genotóxico en una sola prueba. De igual forma se sugiere que la exposición al humo de soldadura debería ser más estudiada incrementando diferentes tipos de biomarcadores que den mayor información y analizar en otro tipo de tejidos el comportamiento de los compuestos del humo de soldadura en el organismo, debido a que los metales pueden bioacumularse en diferentes tejidos debido a que muchos tiene poca eliminación y a su vez sus características fisicoquímicas los hace de fácil entrada y almacenamiento en diferentes tipos de células.

Para complementar este estudio, y tener una mejor descripción de los efectos de la exposición ocupacional al humo de soldadura en las células bucales, se tuvo cuidado de incluir variables de confusión y también se tuvo en cuenta el comportamiento de variables que pueden afectar la frecuencia de anomalías nucleares, debido a que se conoce que algunos factores demográficos como la edad y el estilo de vida de las personas pueden influencian el nivel basal de daño en el ADN genómico. Por lo tanto, estudios de biomonitorio humano que utilicen el ensayo citómico 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 (Gonzales-Yebra et al., 2009). Con relación a la edad, los reportes obtenidos en otros estudios son contradictorios a los obtenidos en el presente estudio. Algunos estudios han encontrado asociación entre la edad y la frecuencia de MN (Pinto et al. 2000; Roma-Torres et al. 2006), mientras que otros estudios concluyen que la edad no afecta la frecuencia de MN en células exfoliadas del epitelio bucal (Fenech 1985, Konopacka et al. 2003; Odio et al. 2005; Benites et al. 2006) todos estos en estudios realizados en poblaciones de pintores de carros, en trabajadores en una refinería de petróleo, en una población sana, en una población de fumadores, una población de soldados y una población en una estación de gasolina respectivamente. En este estudio los análisis de regresión mostraron que la edad está asociada sólo con la frecuencia de brotes nucleares, pero no con las otras anomalías, es decir que los brotes nucleares al ser un marcador de inestabilidad genómica es normal que se incrementen por la edad de los individuos. De acuerdo con Barnett and King (1995) la influencia de la edad con la genotoxicidad y citotoxicidad, posiblemente son el reflejo del incremento espontáneo de la inestabilidad genómica con la edad,

asociada con una acumulación de daño en el ADN debido a un deterioro progresivo de la capacidad del sistema de reparación del ADN. Para controlar el efecto de la edad sobre el aumento en la expresión de anomalías nucleares los individuos del grupo expuesto fueron emparejados por edad con los individuos del grupo referente (no expuesto) con una diferencia máxima de ± 2 años. Este tipo de diseño se realizó con el propósito de eliminar las diferencias del daño en el ADN y el daño citotóxico por la influencia de la edad entre los grupos de estudio, de manera que los resultados de la investigación expresaran el efecto de la exposición ocupacional al humo de soldadura.

Para la variable tiempo de exposición al observar los otros estudios en células bucales se observa que sólo se reporta una asociación significativa en la investigación realizada por Danadevi et al. (2004), que encontró una influencia del tiempo de exposición con el incremento de MN. En otros dos estudios realizados en soldadores como el de Odio et al. (2005) y Tejedor (2011) no se menciona que se haya realizado un análisis para el tiempo de exposición y la influencia en la frecuencia de anomalías nucleares. En otros estudios realizados en soldadores que emplearon biomarcadores como el ensayo cometa, no se observó una relación entre el incremento del daño genómico con el tiempo de exposición al humo de soldadura (Sardas et al. 2010; Zhu et al. 2001). En cuanto a los resultados obtenidos en este estudio se encontró asociación lineal positiva entre el tiempo de exposición (años) como soldador y el incremento del efecto citotóxico determinado por anomalías nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal (CP, CR y CL). Luego, analizar la variable tiempo de exposición fue importante para esta investigación ya que se demostró un mayor efecto citotóxico proporcional al tiempo de exposición. Se puede decir que a mayor tiempo de exposición las personas van acumular más daño y al ser más susceptibles por deterioro de funciones celular corren el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades de origen ocupacional.

El consumo de alcohol se ha demostrado que se asocia con la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica (Fenech et al., 2011), en cuanto a MN en células exfoliadas no se ha encontrado una asociación con dicho consumo. Según Bonassi et al. (2011) la fiabilidad de la relación consumo de alcohol y frecuencia de MN es muy baja especialmente en un contexto internacional, donde la cultura, el tipo de bebidas y el consumo de alcohol puede cambiar drásticamente. Por otra parte en algunos estudios se asocia el consumo crónico de bebidas alcohólicas con un aumento de lesiones en el ADN, como bases oxidadas y roturas de cadena sencilla que son generadas durante el metabolismo del etanol al producirse especies reactivas de oxígeno como el radical libre hidroxietilo (Weng et al. 2010; Yan et al. 2011). De igual forma el alcohol interfiere en la apoptosis y está estrechamente ligado con el desarrollo de cáncer de hígado (Rana 2008). Por otra parte los resultados obtenidos por los estudios de biomonitoring que han empleado células exfoliadas del epitelio bucal como Garcia et al. (2012), Hallare et al. (2009), Correia et al. (2009), Martinez-Valenzuela et al. (2009), Benites et al. (2006), Celik

et al. (2003), concuerdan con los resultados del presente estudio puesto que no se encontró una relación significativa entre la frecuencia de anomalías nucleares determinado por el ensayo citómico y el consumo de alcohol, posiblemente porque los participantes de la investigación manifestaron tener poca ingesta de alcohol. Además los resultados muestran que no hubo diferencia significativa entre el grupo expuesto al humo de soldadura y el grupo referente (no expuesto) respecto al consumo de alcohol.

En cuanto al hábito de consumo de cigarrillo según Vadhanam et al. (2012) 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. La nicotina también interfiere en la apoptosis y esta estrechamente ligado con el desarrollo de cáncer de pulmón. Por otra parte en estudios realizados en células exfoliadas del epitelio bucal, Nersesyan et al. (2000a, 2011b) detectó que el hábito de fumar tiene un efecto sobre el daño en el ADN genómico, debido a que los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativamente ($p > 0.05$) de daño en el ADN en fumadores comparado con los no fumadores. En otros biomonitoreos realizados con soldadores se observó una correlación entre la exposición ocupacional al humo de soldadura y el consumo de cigarrillo (Zhu et al. 2001; Lam et al. 2002; Sardas et al. 2010). De igual forma, también existen reportes de investigaciones con grupos pequeños de fumadores y no fumadores que no encuentran diferencia entre ambos respecto al daño genómico (Roma-Torres et al. 2006; Fracasso et al. 2009; Moro et al. 2012). Con base en lo anterior, es evidente que el consumo de cigarrillo debe ser tenido en cuenta como criterio de exclusión debido a que éste puede ser considerado un factor de confusión en estudios que utilicen el ensayo citómico para detectar daño en el ADN genómico y muerte celular. Por lo tanto, para evitar confusiones sobre el daño generado por el consumo del cigarrillo y el daño generado por la exposición ocupacional en este estudio, se excluyó individuos fumadores y ex fumadores para que de esta forma los resultados que arrojaran la investigación mostraran de una forma más clara la asociación entre la exposición ocupacional al humo de soldadura y el daño en el ADN y muerte celular.

Finalmente es importante resaltar que este estudio es el primero que se realiza en una población colombiana expuesta al humo de soldadura con una población objeto de estudio de 110 individuos (55 expuestos / 55 referentes – no expuestos), en el cual se analizan todos los biomarcadores del ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio bucal. Según los resultados obtenidos en este estudio se podría decir que esta población es vulnerable por el efecto citotóxico y genotóxico producido por la exposición al humo de soldadura en su entorno de trabajo. Debido a que el efecto genotóxico producido por la exposición podría desencadenar en el desarrollo de enfermedades como el cáncer y a su vez la población de soldadores es vulnerable de desarrollo de enfermedades relacionadas con el exceso de apoptosis como la enfermedad de parkinson u otras

enfermedades neurodegenerativas, enfermedades que han sido relacionadas anteriormente con la exposición al humo de soldadura. Por tal motivo con la socialización y publicación de los resultados obtenidos se espera que toda esta información generada pueda contribuir para establecer controles apropiados y políticas de prevención y promoción en salud sobre poblaciones expuestas al humo de soldadura, debido a que hasta el momento no se conocen programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional (VEO) direccionados a la prevención de enfermedades de origen ocupacional que permitan mejorar la calidad de vida de la población de soldadores colombianos. De igual forma este estudio también permite demostrar que la aplicación del ensayo citómico es útil para el reconocimiento de efectos citotóxicos y genotóxicos en poblaciones expuestas a agentes químicos, por lo tanto se recomienda esta prueba para evaluar los efectos producidos por otros tipos de exposiciones.

9. CONCLUSIONES

La frecuencia de células picnóticas, células carioréticas y células cariolíticas del ensayo citómico indicadores de efecto citotóxico en células exfoliadas del epitelio bucal mostró un aumento estadísticamente significativo en el grupo expuesto con respecto al grupo referente, para el caso de células con cromatina condensada hubo una disminución estadísticamente significativa en el grupo expuesto respecto al grupo referente, excepto para células binucleadas, lo cual indica que la exposición ocupacional al humo de soldadura en la población objeto de estudio, que no emplean equipos de protección personal, inducen un aumento de daño citotóxico en las células exfoliadas del epitelio bucal. Por tal motivo esta población se encuentra en riesgo en el desarrollo de enfermedades de origen ocupacional por efecto citotóxico causado por esta exposición.

La exposición ocupacional al humo de soldadura generó un incremento no significativo en las anomalías nucleares indicadores de efecto genotóxico (micronúcleos y brotes nucleares) en las células exfoliadas del epitelio bucal. Los resultados obtenidos indican una asociación entre los biomarcadores de efecto genotóxico y citotóxico, según esto se puede decir que la exposición al humo de soldadura induce daño celular en el ADN hasta el punto de producir aumento de muerte celular en las células exfoliadas del epitelio bucal de los soldados de la ciudad de Popayán. Luego los efectos adversos para la salud de los soldados pueden ser causados por inestabilidad genómica.

Se observó una asociación entre la frecuencia de anomalías nucleares de efecto citotóxico como células con cromatina condensada, células picnóticas, células carioréticas y células cariolíticas con el tiempo de exposición. Se encontró asociación entre la anomalía nuclear de efecto genotóxico brotes nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal de la población objeto de estudio, estimado mediante el ensayo citómico y la variable de confusión edad. No se encontró asociación entre el daño en el ADN y muerte celular en células exfoliadas del epitelio bucal de personas expuestas ocupacionalmente al humo de soldadura y la variable de consumo de alcohol.

El ensayo citómico tiene biomarcadores para identificar el daño en el ADN genómico y la muerte celular. Este ensayo es útil para la identificación de riesgo de desarrollar enfermedades ocupacionales en poblaciones expuestas a agentes xenobióticos como el humo de soldadura. También las características de fácil aplicación y obtención de la muestra hace que este ensayo pueda ser empleado como una herramienta en futuros programas de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional (VEO).

10. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del presente estudio fueron presentados a los individuos objeto de estudio, a través del curso taller “Salud y Trabajo”, en el cual se dieron a conocer los riesgos a la salud asociados con la exposición al humo de soldadura, entre ellos el riesgo de desarrollar enfermedades complejas como el cáncer para que la población de soldadores tome conciencia sobre la importancia de usar equipos de protección personal (EPP) para disminuir la exposición a compuestos que puedan ser dañinos para el organismo.

De igual forma a través de la publicación de los resultados, se brindara información que puede ser útil a las instituciones gubernamentales para el desarrollo de políticas de seguridad pública en torno a la salud ocupacional. También se dará un aporte sobre la exposición al humo de soldadura, puesto que no existe suficiente información. Así mismo con la publicación del respectivo artículo científico en una revista indexada se espera hacer una contribución para ser tenido en cuenta por el proyecto internacional HUMN_{XL}, el cual busca la validación de los micronúcleos y las otras anomalías nucleares del ensayo citómico en células exfoliadas del epitelio epitelial como predictores para el riesgo de desarrollar cáncer.

11. RECOMENDACIONES

Es importante realizar otros estudios de biomonitoreos en poblaciones expuestas ocupacionalmente al humo de soldadura debido a que según la IARC y la literatura no se encuentra suficiente información acerca de los riesgos de esta exposición, ejemplos de estas investigaciones podrían ser: realizar monitoreos ambientales en los lugares de trabajo de los soldadores para determinar de manera específica la concentración de los compuestos químicos a los que están expuestos los soldadores en su lugar de trabajo.

Estimar la concentración de los metales pesados presentes en la sangre y productos metabólicos en la orina de los soldadores. También se puede recomendar identificar genotipos polimórficos de genes de reparación del ADN en la muestra poblacional, para determinar individuos que puedan ser más susceptibles de daño en el ADN genómico por la exposición ocupacional a estos compuestos xenobióticos.

En cuanto a la utilización del ensayo citómico según los resultados obtenidos se recomienda emplear esta prueba con todos sus biomarcadores de daño en el ADN genómico y muerte celular en diferentes poblaciones expuestas a químicos puesto que posee ventajas en la metodología, de igual forma se recomienda para este caso en particular aumentar el tamaño muestral de las población al humo de soldadura.

BIBLIOGRAFÍA

- Antonini, J., A. Afshari, et al. (2006). "Design, construction, and characterization of a novel robotic welding fume generator and inhalation exposure system for laboratory animals." *Journal of occupational and environmental hygiene* **3**(4): 194-203.
- Antonini, J. M. (2003). "Health effects of welding." *CRC Critical Reviews in Toxicology* **33**(1): 61-103.
- Antonini, J. M., A. B. Lewis, et al. (2003). "Pulmonary effects of welding fumes: review of worker and experimental animal studies." *American journal of industrial medicine* **43**(4): 350-360.
- Antonini, J. M., M. D. Taylor, et al. (2004). "Suppression in lung defense responses after bacterial infection in rats pretreated with different welding fumes." *Toxicology and applied pharmacology* **200**(3): 206-218.
- Antonini, J. M., M. D. Taylor, et al. (2004). "Pulmonary responses to welding fumes: role of metal constituents." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **67**(3): 233-249.
- ATDSR, Agency for toxic substances and diseases registry – ToxFAQs (1993). Toxicological profile for: Lead, Cadmium, Nickel, Vanadium and Zinc. University of Utah. Available on line. Website: <http://www.atrdr.cdc.gov/toxfaq.html>
- Barnett, Y., King, C. (1995). An investigation of antioxidants status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans, *Mutation Research*. 338 115–128
- Benedetti, D., Nunes, E., Sarmiento, M., Porto, C., Santos, C.E.I.d., Dias, J.F., and da Silva, J. (2013). Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 752, 28-33.
- Benites, C., Amado, L., Vianna, R., Martino-Roth, M. (2006) Micronucleus test on gas station attendants, *Genetic Molecular*. 5 45–54.
- Bernard, A. (2011). "Renal and Neurological Effects Heavy metals in the Environment". *Encyclopedia of Environmental Health*: 801-805.
- Beyersmann, C. A. Hartwing. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Toxicology*. 82 493–512.
- Bonassi, S., E. Coskun, et al. (2011). "The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*.
- Bonassi, E., Murgia, E., M. Ballardin, et al. (2007). "Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 639 (1): 27-34.
- 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.

Bradshaw, L., D. Fishwick, et al. (1998). "Chronic bronchitis, work related respiratory symptoms, and pulmonary function in welders in New Zealand." *Occupational and environmental medicine* 55 (3): 150.

Bureau of Labor Statistics, U. S., Departamento of Labor (2011). "Occupational Outlook Handbook." Welding, soldering, and Brazing Workers. Retrieved Diciembre 28, 2011, from <http://www.bls.gov/oco/ocos226.htm>.

Burgaz, S., Erdem, O., Çakmak, G., Erdem, N., Karakaya, A., and Karakaya, A.E. (2002). Cytogenetic analysis of buccal cells from shoeworkers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers* 7, 151-161.

Carrascal, G. C., H. G. Orozco, et al. (2004). "Exposición ocupacional a solventes orgânicos y alteraciones en la visión del color en trabajadores de una empresa de hidrocarburos."

Çelik, A., Çavaş, T., and Ergene-Gözükara, S. (2003). Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis* 18, 417-421.

Celik, A., S. B. Diler, et al. (2010). "Assessment of Genetic Damage in Buccal Epithelium Cells of Painters: Micronucleus, Nuclear Changes, and Repair Index." *DNA and Cell Biology* 29(6): 277-284.

Çelik, A., S. Yildirim, et al. (2013). "Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92(0): 265-270.

Cepi, M., Biasotti, B., Fenech, M., and Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705, 11-19.

Cooke M.s, Evans M.D., Dizdaroglu m., Lunec j., Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.* 17.2003. 1195-1214

Correia,N., Bassan, J., Cunha, C., Fernandez,R., Bachettini, P., Garcias, G., Roth, M. (2009). Monitoring the genotoxic action in shoe workers by micronuclei test, Pelotas, Rio Grande do Sul State, Ciênc., Saúde Coletiva 14 2251–2260

Cox D, Moore S. (2002) Copper Transporting P-Type ATPases and HumanDisease. *J Bioenergy Biomembre*; 34: 333-8.

Danadevi K, Rozati R, Banu BS, Grover P. (2004) Genotoxic evaluation of welders occupationallyexposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis* 19: 35-41.

DANE (2012). Medición del Empleo Informal. Trimestre móvil septiembre - noviembre 2011. In *Resumen Ejecutivo* (Bogotá, D.C., Colombia: Departamento Administrativo Nacional de Estadística).

Dusinska, M. and A. R. Collins (2008). "The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions." *Mutagenesis* 23 (3): 191-205.

Elias Z, Mur J-M, Pierre F, et al. (1989) Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of welders and characterization of their exposure by biological samples analysis. *J Occupational Medicine*; 31: 477-483.

Ellen, K. and R. Silbergeld (2000). "Toxicología Herramientas y Enfoques." <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>

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.

Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., and Bonassi, S. (2011). The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis* 26, 239-245.

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols* 2, 1084-1104.

Fenech, M. (2006). "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600 (1-2): 58-66.

Fenech, M., Crott, JW. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504 (1-2):131-136

Fenech, M., N. Holland, et al. (1999). "The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 428 (1-2): 271-283.

Fenech, M. and A. A. Morley (1985). "The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 148 (1): 99-105.

Fracasso, M. E., D. Doria, et al. (2009). "DNA single- and double-strand breaks by alkaline- and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene." *Toxicology Letters* 185 (1): 9-15.

Garcia, P.V., Linhares, D., Amaral, A.F.S., and Rodrigues, A.S. (2012). Exposure of thermoelectric power-plant workers to volatile organic compounds from fuel oil: Genotoxic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 747, 197-201.

González-Yebra, A., Kornhauser, C., Barbosa-Sabanero, G., Pérez-Luque, E., and Wrobel, K. (2009). Exposure to organic solvents and cytogenetic damage in exfoliated cells of the buccal mucosa from shoe workers. *International archives of occupational and environmental health* 82, 373-380.

Halasova, E., T. Matakova, et al. (2008). "Chromosomal damage and polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in workers exposed to chromium." *Neuro endocrinology letters* 29 (5): 658-662.

Hallare, a., Gervasio, M., Gervasio, P., Acacio-Claro, P. (2009). Monitoring genotoxicity among gasoline station attendants and traffic enforcers in the City of Manila using the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells, *Environ. Monit. Assess.* 156 331–341.

Holland, N., C. Bolognesi, et al. (2008). "The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps." *Mutat Res* 659 (1-2): 93-108.

Huang, M., S. Zhou, et al. (2008). "Heavy metals in wheat grain: Assessment of potential health risk for inhabitants in Kunshan, China." *Science of The Total Environment* 405 (1-3): 54-61.

Husgafvel, K. and J. Siemiatycki (2010). "Welding fumes. Citation for most recent IARC review IARC Monographs."

IARC (1990). Chromium, nickel, and welding. IN: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. World Health Organization, Ed., Geneva, pp. 447-525.

IARC (1993). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 58, Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry*, Lyon.

INSHT (2009). *Limites de exposición profesional para agentes químicos en España*

Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Chaspoul F, et al. (2005). Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. *Mutagenesis*; 20: 425-432.

Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Orsière T, et al. (2006). A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders. *Mutagenesis*; 21: 159-165.

Jelmert O, Hansteen I-L, Langard S. (1995). Cytogenetic studies of stainless steel welders using the tungsten inert gas and metal inert gas methods for welding. *Mutation Research*; 342: 77-85.

Jelmert, O., I. L. Hansteen, et al. (1994). "Chromosome damage in lymphocytes of stainless steel welders related to past and current exposure to manual metal arc welding fumes." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 320 (3): 223-233.

Karahalil, B., A. E. Karakaya, et al. (1999). "The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 442(1): 29-35.

Kobayashi, S., Orada, T., Kimura, M. (1985). Effects of dexamethasone on metallothionein induction by Zn, Cu and Cd in Chang liver cells. *Chemico-Biological Interactions*, 55 (1):347-356.

Konopacka, M. (2003). "Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells." *Neoplasma* 50 (5): 380.

Knudsen LE, Boisen T, Molin Christensen J, et al. (1992). Biomonitoring of genotoxic exposure among stainless steel welders. *Mutation Research*; 279: 129-143.

Lam, T. H., C. Q. Zhu, et al. (2002). "Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 515 (1–2): 147-157.

Lee, J., N. Koo, et al. (2004). "Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3 (1): 21-33.

Lev, N., Melamed, E., Offen, D. (2003). "Apoptosis and Parkinson's disease". *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27: 245-250.

Lim, R., Schoenung, J. (2010). Human health and ecological toxicity potentials due to heavy metal content in waste electronic devices with flat panel displays. *Journal of Hazardous Materials*, 177 (1-3):251-259

Lymberopoulos, A., V. Kotsaki-Kovatsi, et al. (2000). "Effects of cadmium chloride administration on the macroscopic and microscopic characteristics of ejaculates from Chios ram-lambs." *Theriogenology* 54 (7): 1145-1157.

Manno, M., C. Viau, et al. (2010). "Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA)." *Toxicology Letters* 192 (1): 3-16.

Martínez, C. D., C. R. Vargas, et al. (2003). "Estrés oxidativo y neurodegeneración." <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-6/RFM46606.pdf>

Martínez, C., A. Quero, et al. (2001). "Enfermedades pulmonares profesionales por inhalación de polvos inorgánicos." *Med Hum* 61: 34-39.

Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M., Félix-Gastélum, R., Álvarez-Torres, A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico, *Environmental Mutagenesis*. Int. 35 1155–1159.

Martins, R.A., da Silva Gomes, G.A., Aguiar Jr, O., and Ribeiro, D.A. (2009). Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: Comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environment International* 35, 1062-1065.

Mitchell, J., G. Manning, et al. (1961). "Pulmonary fibrosis in workers exposed to finely powdered aluminium." *British Journal of Industrial Medicine* 18 (1): 10-20.

Moro, A. M., N. Brucker, et al. (2012). "Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*(0).

Murgia, E., M. Ballardin, et al. (2008). "Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 639 (1-2): 27-34.

NIOSH (1977). In: Criteria for a Recommended Standard Occupational Exposure to Inorganic Nickel, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, and National Institute of Occupational Safety and Health. Eds., Publication No. 77-164.

Nersesyan, A. K. (2005). "Nuclear buds in exfoliated human cells." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 588 (1): 64-68.

Norbury, C. J. and I. D. Hickson (2001). "Cellular responses to DNA damage." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41 (1): 367-401.

Nuernberg AM, Boyce PD, Cavallari JM, Fang SC, Eisen EA, Christiani DC. Urinary 8-isoprostane and 8-OHdG concentrations in boilermakers with welding exposure. *J Occup Environ Med* 2008; 50: 182-189.

Ochoa, F. and L. Montoya (2009). Mortalidad por Cáncer en Colombia en 2005, *Ces Medicina*. 57.

Odio, D., Ivette, E., Vázquez, R., Ibrahim, L., García, R., Carlos, J., Tito, R., and Andrés, I.P. (2005). en trabajadores expuestos a productos químicos. *Rev Med IMSS* 43, 221-227.

OMS (2011). Conferencia internacional sobre determinantes ambientales y laborales del cáncer: intervenciones para la prevención primaria, OMS Ginebra.

OSALAN. (2009). El soldador y los humos de soldadura. Instituto Vasco de Seguridad y Salud Laborales. Gobierno Vasco. Departamento de Empleo y Asuntos Sociales.

Ozdemir, O., N. Numanoğlu, et al. (1995). "Chronic effects of welding exposure on pulmonary function tests and respiratory symptoms." *Occupational and environmental medicine* 52 (12): 800-803.

Patti, Z. E., K. Michael, et al. (2008). "Pulmonary inflammation and tumor induction in lung tumor susceptible A/J and resistant C57BL/6J mice exposed to welding fume." *Particle and Fibre Toxicology* 5.

Pereira, R., R. Ribeiro, et al. (2004). "Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal)." *Science of The Total Environment* 327 (1-3): 81-92.

Pinto, D., Ceballos, J.M., García, G., Guzmán, P., Del Razo, L.M., Vera, E., Gómez, H., García, A., and Gonsebatt, M.E. (2000). Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 467, 105-111.

Rana, S. V. S. (2008). "Metals and apoptosis: recent developments." *Journal of trace elements in medicine and biology* 22 (4): 262-284.

Rohr, P., da Silva, J., da Silva, F.R., Sarmiento, M., Porto, C., Debastiani, R., dos Santos, C.E.I., Dias, J.F., and Kvitko, K. (2013). Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54, 65-71

Rojas, J. (2009). El soldador y los humos de soldadura. http://www.osalan.euskadi.net/s94osa0017/es/contenidos/libro/higiene_200920/es_200920/soldador.html

Roma-Torres, J., J. P. Teixeira, et al. (2006). "Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 604 (1–2): 19-27.

Rosin, M. P. (1992). "The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 267 (2): 265-276.

Sardas, S., G. Z. Omurtag, et al. (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 (9): 601-608.

Schins RP. 2002. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol* 14:57–78.

Schins RP. 2002. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhalation Toxicology* 14:57–78.

Schins, R. & Borm, P. Mechanism and mediators in coal Dust Induced toxicity: A review. *Ann. Occupational Hygienist*. 1999. Vol. 32 No 1: p. 7- 33

Shi, Q., King,R.W.,(2005).Chromosome non disjunction yieldste triploid rather aneuploid cells in human cell lines.*Nature*437,1038–1042.

Sjogren, B., T. Fossum, et al. (2002). "Welding and ischemic heart disease." *International journal of occupational and environmental health* 8 (4): 309-311.

Sriram, k., Lin, G.X., Jefferson, A.M., Roberts, J.R., Andrews, R.N., Kashon M.L., Antonini, J.M., (2012). Manganese accumulation in nail clippings as a biomarker og welding fume exposure and neurotoxicity. *Toxicology* 291, 73-82.

Sriram, K., A. Jefferson, et al. (2011). "Manganese accumulation in nail clippings as a biomarker of welding fume exposure and neurotoxicity." *Toxicology*.

Sriram, K., Lin, G.X., Jefferson, A.M., Roberts, J.R., Chapman, R.S., Chen, B.T., Soukup, J.M., Ghio, A.J., Antonini, J.M., (2010a). Dopaminergic neurotoxicity following pulmonary exposure to manganese-containing welding fumes. *Arch. Toxicol.* 84 (7), 521–540.

Sriram, K., Lin, G.X., Jefferson, A.M., Roberts, J.R., Wirth, O., Hayashi, Y., Krajnak, K.M., Soukup, J.M., Ghio, A.J., Reynolds, S.H., Castranova, V., Munson, A.E., Antonini, J.M., (2010b). Mitochondrial dysfunction and loss of Parkinson's disease-linked proteins contribute to neurotoxicity of manganese-containing welding fumes. *FASEB J.* 24 (12), 4989–5002.

Steenland, K., D. Loomis, et al. (1996). "Review of occupational lung carcinogens." *American Journal of Industrial Medicine* 29 (5): 474-490.

Stellman, J. M. and J. Finklea (1999). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones.

Tafur, F. (2005). Informe de enfermedad profesional en Colombia, 2003-2005. Grupo de fomento de salud de los trabajadores Bogotá: Ministerio de Protección Social de Colombia.

Tapia, S. and M. Araya (2006). "Estrés oxidativo, prooxidantes y enfermedad de Crohn." *Revista médica de Chile* 134 (1): 95-100

Tejedor Cassiani, I. A. (2011). Biomonitorio de células bucales a partir de micronúcleos en soldadores de metales en Cartagena (Bolívar)/Biomonitoring of buccal cells from micronuclei in welders metals in Cartagena (Bolívar), Universidad Nacional de Colombia.

Thomas, P. and M. Fenech (2011). "Buccal micronucleus cytome assay." *Methods Molecular Biology* 682: 235-248.

Thomas, P., N. Holland, et al. (2009). "Buccal micronucleus cytome assay." *Nature Protocols* 4 (6): 825-837.

Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., Fenech, M. (2008). The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls, *Mutat. Res.* 638 37-47.

Thomas, P., Hecker, J., Faunt, J., Fenech, M. (2007). Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease, *Mutagenesis* 22 371-379.

Tolbert, P. E., C. M. Shy, et al. (1992). "Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 271 (1): 69-77.

Turkez, H., F. Geyikoglu, et al. (2010). "The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood." *Experimental and Toxicologic Pathology*.

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.

Vodicka, P., R. Kumar, et al. (2004). "Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA." *Carcinogenesis*. 25 (5): 757-763.

Ward, E. M., P. A. Schulte, et al. (2010). "Research recommendations for selected IARC-classified agents." *Environmental health perspectives* 118 (10): 1355.

West Arco. Entrevista Panorama Optimista para el Sector soldador en Colombia. (2010). *Revista Metal Actual*. 16: 4-8.

Weng, H., Z. Weng, et al. (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 (2): 132-136.

Werfel U, Langen V, Eickhoff I, et al. Elevated DNA single-strand breakage frequencies in lymphocytes of welders exposed to chromium and nickel. *Carcinogenesis* 1998; 19: 413-418.

Yan, Y., J. Y. Yang, et al. (2011). "Possible Metabolic Pathways of Ethanol Responsible for Oxidative DNA Damage in Human Peripheral Lymphocytes." *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 35 (1): 1-9.

Zeidler-Erdely PC, Kashon ML, Battelli LA, et al. (2008) Pulmonary inflammation and tumor induction in lung tumor susceptible A/J and resistant C57BL/6J mice exposed to welding fume. *Particle Fibre Toxicology*; 5: 12.

Zhitkovich A, Voitkun V, Kluz T, Costa M. Utilization of DNA-protein cross-links as a biomarker of chromium exposure. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (SUPPL. 4): 969-974.

Zhu, C. Q., T. H. Lam, et al. (2001). "Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing cworkers." *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491 (1-2): 173-181.



**ANEXO A
ENCUESTA
“IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y
GENOTÓXICO DEL HUMO DE SOLDADURA EN PERSONAS
EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE, MEDIANTE EL ENSAYO
CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO
BUCAL.”**

LUGAR	FECHA	DD	MM	AA	CODIGO	ENCUESTADOR

Favor responder las siguientes preguntas de forma sincera, clara y concisa

I. INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre Completo				Estado Civil	1. Soltera		2. Casado	
Dirección Casa				Sexo	1. M		2. F	
Celular o teléfono fijo				Edad (años):			Lugar de Nacimiento:	
Nivel de Educación	Primaria			Secundaria			Universitaria	
Grupo	1. Expuesto	Años		2. No expuesto	Años			
Trabajador independiente	Empresa		Nombre empresa		Dirección de empresa			

II. INFORMACIÓN SOBRE EL ESTADO DE SALUD

Ha sufrido problemas de salud tales como:

Enfermedad	Si	No	Tratamiento			Enfermedad	Si	No	Tipo
1. Hepatitis			A	B	C	3. Herpes			
2. Meningitis						4. Cáncer			
Otras ¿Cuáles?						5. Alzheimer			

Si usted consume algún tipo de medicamento por favor responda:

Medicamento	Si	No	Dosis	Desde (fecha)	Hasta (fecha)	Actualmente

Alguna vez por causa de una enfermedad ha estado hospitalizado	Si	No	
¿Que enfermedad?			
Has recibido algún tipo de tratamiento	Si	No	
¿Qué tipo de tratamiento?			

En su familia (abuelos, padres, hijos, tíos, primos, etc.) hay problemas de salud:

Trastorno	Si	No	Pariente	Tipo u observaciones
Cáncer				
Síndrome de Down o Mongolismo				
Abortos e.				
Esterilidad				
Trastornos del Sist. Nervioso (convulsiones, fatiga, alucinaciones, delirios, trastorno de equilibrio, astenia, somnolencia o sordera)				

III. INFORMACIÓN HABITUAL DE CONSUMO DE SUSTANCIAS ADICTIVOS CIGARRILLO

Ex consumo de Cigarrillo	Numero de cigarrillos consumidos por día					Meses sin el habito		Observaciones
	<10	10 -20	20-30	30-40	>40			

ALCOHOL

Tipo	Si	No	Días/Semana	Días/Mes	Observaciones
Aguardiente					
Cerveza					
Ron					
Brandy					
Whisky					
Vino					
Ex bebedor					

DROGAS PSICOACTIVAS

Tipo	Si	No	Ex Cons	Años	Meses	Frecuencia		
						Diario	Semanal	Mensual
1.Marihuana								
2.Cocaina								
3.Basuco								
4.Heroína								
5.Morfina								
6.Extasis								
7.Otras								

ANTECEDENTES LABORALES

ACTIVIDAD	SI	NO	DESCRIPCIÓN
Plaguicidas-Agroqcos			

Radiación Ionizantes			
Minería			
Qcos Industriales			
Fundición			

IV. INFORMACIÓN SOBRE HÁBITOS ALIMENTICIOS Y NUTRICIÓN

EDAD										
1. Entre 18 y 30 años			2. Entre 30 y 50 años			3. Mas de 50 años				
MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS										
1. Estatura		2. Peso								
INFORMACIÓN NUTRICIONAL										
CONSUMO DE FRUTAS										
¿Cuántas frutas consumen a la semana en sus comidas?										
1) 1 o 2		2) 3 0 4		3) 4 o 5		4) Mas de 5		5) No consume		
CONSUMO DE VERDURAS/Hortalizas										
¿Cuántas verduras/hortalizas consume al día en sus comidas?										
1) 1 o 2		2) 3 0 4		3) 4 o 5		4) Mas de 5				
¿Consume alimentos con Sal?			Si		No		Muy poco		Suficiente	
¿Consume agua?						Si		No		
¿Cuántos vasos de agua al día?				1) 1 0 2		2) 3 0 4		3) Mas de 5		

V. INFORMACIÓN SOBRE ESTILOS DE VIDA

¿Realiza actividad física?					Si		No		
¿Cuántas veces a la semana?		1) 1	2) 2 0 3		3) 4 0 5		4) Mas de 5		
¿Cuántas horas al día?		1) 1	2) 2	3) 3		4) Mas de 4			
¿Cuántas horas labora al día?				1) 8	2) 10		3) Mas de 12		
¿Descansa en sus horas laborales?			1) Si	2) No		3) A veces			

VI. INFORMACIÓN SOBRE HIGIENEN ORAL

¿Cuántas veces al día se cepilla los dientes?			1) 1	2) 2 0 3		3) 4 o 5			
¿Que marca de crema dental utiliza?									
¿Utiliza enjuague bucal						Si		No	
¿Cuántas veces al día?				1) 1	2) 2		3) 3		
¿Qué marca de enjuague bucal utiliza?									
¿Le sangra las encías al cepillarse?						Si		No	
¿Ha sufrido alguna afección en las encías?						Si		No	
¿Qué tipo de afección?									
¿Ha tenido lesiones en la mucosa oral?						Si		No	
¿Cuál?									

ANEXO B
CONSENTIMIENTO INFORMADO
MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE AL
HUMO DE SOLDADURA

EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA De La Universidad del Cauca realizara el estudio **“IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL HUMO DE SOLDADURA EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE, MEDIANTE EL ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL.”**

PROPOSITO DEL ESTUDIO Establecer la asociación entre la frecuencia de Micronúcleos en células del epitelio bucal en personas ocupacionalmente expuestas a el humo de soldadura. El propósito de este estudio es contribuir en la validación del ensayo de Micronúcleos en células del epitelio bucal como biomarcador de riesgo potencial del desarrollo de problemas de salud por la exposición ocupacional al humo de la soldadura. Este método tiene la ventaja de ser económico y mínimamente invasivo, resultando útil en el biomonitoreo de poblaciones ya que permite detectar tempranamente células pre-neoplásicas de boca en personas expuestas a agentes tóxicos. Esta investigación tiene relevancia social, científica y obedece a una problemática de salud ocupacional actual.

BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE: atender a cursos de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por la exposición ocupacional al humo de soldadura, invitar a la reflexión y motivación hacia el cambio de actitud para la prevención de riesgos a la salud por este tipo de exposición y conocer resultados grupales del estudio.

RIESGO DE PARTICIPACIÓN: Se protegerá en todo los derechos de cada uno de los individuos involucrados. La toma de la muestra de células bucales no incluye riesgos potenciales contra la salud. La universidad del Cauca es responsable de la competencia, formación integral, y calidad de los investigadores que tomen la muestra. Las células del epitelio bucal serán extraídas con un utensilio apropiado para tal fin y en forma aséptica por parte de personal ampliamente calificado, para evitar cualquier riesgo o complicación. Igualmente se compromete a proteger rigurosamente la confidencialidad de la información personal, los resultados del estudio y la privacidad en la que se realizarán las encuestas.

METODOLOGIA: Se realizará un estudio epidemiológico molecular de corte transversal, en el cual serán seleccionados 55 trabajadores expuestos al humo de soldadura y 55 personas no expuestas como grupo referente; con el fin de diferenciar al momento del análisis de resultados que individuos son mas susceptibles a la exposición ocupacional. Cada individuo debe contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos, para suministrar información personal referente a su edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar. Cada individuo seleccionado para el estudio debe dar una muestra de células bucales, que se extraerá del interior de las dos mejillas con un cepillo citológico especial y con todas las medidas sanitarias requeridas para minimizar cualquier riesgo de infección. Estas células serán procesadas en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para la prueba de Micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal.

MANEJO DE LA CONFIDENCIALIDAD: Dentro de este estudio se protegerá la privacidad de los individuos participantes. Para mantener la confidencialidad de toda la información recolectada con las encuestas la cual será codificada con el mismo código asignado a las muestras del epitelio bucal, de tal forma que se desconozca la procedencia o identidad del participante durante el tiempo del uso de la muestra de las muestras. Los resultados obtenidos con este estudio serán protegidos y custodiados en bases de datos en computadores con clave, cuyo acceso estará limitado solamente a la persona responsable del estudio, con el fin de evitar la estigmatización de los individuos y la adulteración de los datos. Para efectos de publicación todos los resultados se presentaran en forma anónima, y de ninguna forma se dará a conocer el nombre del participante.

RESPONSABLE DE LA INFORMACIÓN: La docente de la Universidad del Cauca, Luz Stella Hoyos identificada con c.c. 32`331.874 de Envigado, es responsable del estudio, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética en la carrera 2' No. 1ª 25 Barrio Caldas, Popayán, en los teléfonos 8209800 Ext. 2615.

_____, mayor de edad, en pleno uso de mis facultades mentales, libre y consciente de que he sido informado que: Mi participación es completamente voluntaria, puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo, o puedo tomar libremente, la decisión de finalizar mi participación en este biomonitorio en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo.

Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante y después del estudio, a Luz Stella Hoyos, docente de la Universidad del Cauca y responsable del estudio. Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje que yo he podido entender . Los riesgos y molestias que pueden presentarse me han sido explicados claramente. Tengo en claro que no se me proveerá con ninguna compensación económica. También entiendo que mi nombre no será vinculado con los resultados del estudio, la profesora Luz Stella Hoyos no estará en la posibilidad de informar a ninguna otra persona sobre mis resultados de las pruebas. Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se dé a conocer mi nombre. He leído este consentimiento, he entendido en que consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico **“IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL HUMO DE SOLDADURA EN PERSONAS EXPUESTAS OCUPACIONALMENTE, MEDIANTE EL ENSAYO CITÓMICO EN CÉLULAS EXFOLIADAS DEL EPITELIO BUCAL.”**

Nombre del Participante

Firma del Participante

Nombre del Testigo N° 1

Firma del Testigo N°1

Luz Stella Hoyos G.
Director del proyecto