

Biomarcadores de susceptibilidad y efecto en pintores de carros expuestos a solventes orgánicos

Biomarkers of susceptibility and effect in car painters exposed to organic solvents

Marcela Varona-Uribe¹, Milcíades Ibáñez-Pinilla¹, Leonardo Briceño-Ayala¹, Diego Herrera¹, Lilian Chuaire-Noack², María Martínez-Agüero³, Magda Carolina Sánchez Corredor³, Ruth Palma-Parra⁴, Diana Narvaez⁵ and Helena Groot de Restrepo⁵

marcela.varona@urosario.edu.co

1 Universidad del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. 2 Universidad del Valle, Facultad de Salud, Escuela de Ciencias Básicas, Cali, Colombia. 3 Universidad del Rosario, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Bogotá, Colombia. 4 Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. 5 Universidad de los Andes, Laboratorio de Genética Humana, Bogotá, Colombia,



ACCESO ABIERTO

Citación: Varona UM, Ibáñez PM, Briceño AL, Sánchez CMC, Palma PR, Groot DRH. Colomb Med (Cali). 2020; 51(1): e3646. <http://doi.org/10.25100/cm.v51i1.3646>

Recibido: Nov 16 2017

Revisado: Apr 24, 2018

Aceptado: Jul 21 2019

Publicado: Mar 30 2020

Palabras clave:

Xilenos; tolueno; benceno; pruebas de micronúcleos; polimorfismo genético; teratógenos; mutágenos; acetona; disolventes; metanol; cloruro de metileno; especies reactivas de oxígeno; exposición ocupacional

Keywords:

Occupational exposure; micronucleus test; genetic polymorphism; benzene; toluene; xylene; solvents; methylene chloride; acetone; reactive oxygen species; teratogens; mutagens;

Copyright: © 2020 Universidad del Valle.



Resumen

Introducción:

Los pintores de vehículos automotores están rutinariamente expuestos a agentes como los solventes orgánicos, capaces de producir efectos mutágenos y carcinógenos.

Objetivo:

Caracterizar la susceptibilidad poblacional y evaluar los efectos genotóxicos debidos a la exposición a solventes orgánicos.

Métodos:

Estudio de corte transversal que comparó a un grupo de pintores de carros expuestos a solventes orgánicos con un grupo de personas no expuestas. Fueron determinados tanto los polimorfismos de CYP2E1 como la presencia de micronúcleos en linfocitos

Resultados:

Participaron 122 personas, 62 trabajadores de talleres de pintura de autos expuestos a solventes y 60 personas no expuestas. Con relación al cuestionario Q 16, 32% de los expuestos refirieron síntomas sugestivos de neurotoxicidad. Las frecuencias de células micronucleadas y de puentes nucleoplásmicos fueron significativamente mayores en los expuestos que en los no expuestos: $p=0.042$ y $p=0.046$, respectivamente, Razón de verosimilitud exacta). Fueron halladas diferencias significativas en la interacción de CYP2E1 (c1c1) y la exposición ocupacional a solventes, con mayores frecuencias de micronúcleos ($p=0.013$) y de células micronucleadas ($p=0.015$).

Conclusiones:

Este estudio reafirma que los trabajadores expuestos a solventes orgánicos con polimorfismos de CYP2E1, específicamente con genotipo c1c1, tienen mayor probabilidad de presentar mutaciones en las células somáticas, condición asociada

Conflicto de intereses

Ninguno de los autores tiene ningún conflicto de interés para declarar

Agradecimientos

A todos los trabajadores y compañías que participaron en este estudio y a nuestras instituciones: Universidad del Rosario, Universidad de Los Andes e Instituto Nacional de Salud.

Financiación:

Este estudio fue financiado con recursos de Universidad del Rosario, Universidad de Los Andes e Instituto Nacional de Salud

Autor de correspondencia:

Marcela Varona-Uribe. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario. Carrera 24 63C-69. Bogotá DC, Colombia. e-mail: marcela.varona@urosario.edu.co

con una mayor susceptibilidad a enfermedades como el cáncer

Abstract

Introduction:

Car painters are routinely exposed to organic solvents classified as carcinogenic and mutagenic substances.

Objective:

To characterize the population susceptibility and evaluate the genotoxic effects of exposure to organic solvents.

Methods:

A cross-sectional study comparing a group of car painters exposed to organic solvents with a non-exposed group. CYP2E1 polymorphisms and the presence of micronuclei in lymphocytes were determined.

Results:

One hundred twenty-two workers participated in the study: 62 who worked in car paint shops and were exposed to solvents, and 60 who were not exposed. There were statistically significant differences between the two groups regarding micronucleated cells and nucleoplasmic bridges frequencies ($p=0.042$ and $p=0.046$, respectively; exact likelihood ratio). Significant differences were found at the interaction between the CYP2E1 genotype c1c1 and occupational exposure to solvents, with higher frequencies of micronuclei ($p=0.013$) and micronucleated cells ($p=0.015$). However, when the frequencies of micronuclei, micronucleated cells and nucleoplasmic bridges in the exposure group were compared between the c1c1 and c2c2/c1c2 allele groups of the CYP2E1 polymorphism, statistically significant differences were found.

Conclusions:

This study confirms that when workers with CYP2E1 polymorphisms, specifically the c1c1 genotype, are exposed to organic solvents, they are more likely to have somatic cell

mutations, a condition associated with increased susceptibility to diseases such as cancer.

Introducción

Los trabajadores de los talleres de pintura de automotores están expuestos a una compleja mezcla de solventes orgánicos que incluyen químicos como xileno, metanol, tolueno, benceno, cloruro de metileno, acetona, e hidrocarburos aromáticos, entre otros ¹.

Una vez dentro del cuerpo, los solventes orgánicos desencadenan reacciones metabólicas detoxificantes, a través de la actividad enzimática de familias proteicas como la del citocromo P450. Este proceso genera intermediarios tóxicos como radicales libres y especies reactivas de oxígeno ^{2,3}, que pueden causar daños en el DNA ⁴. Cuando estos daños no son correctamente reparados, pueden fijarse y dar origen a mutaciones en las células somáticas, lo que incrementa el riesgo de algunas enfermedades como el cáncer ⁵.

Por otro lado, los solventes orgánicos son consideradas sustancias altamente mutagénicas, clastogénicas, carcinogénicas y teratogénicas. En particular, el benceno exhibe propiedades hemotóxicas, inmunotóxicas, citotóxicas y genotóxicas ⁶ y está asociado con el incremento en el riesgo de leucemia ⁷. Esta situación ha llevado al Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) a clasificar la pintura de vehículos automotores como un proceso industrial carcinogénico ⁸.

Los efectos de la exposición a solventes orgánicos pueden ser evaluados mediante los efectos genotóxicos y los biomarcadores de susceptibilidad. Es esta medida, los ensayos de micronúcleos por detención de la citocinesis (Cytokinesis-block micronucleus assay - CBMN) son actualmente una de las técnicas más usadas para evaluar pérdidas o rupturas cromosómicas resultado de la exposición a agentes genotóxicos⁹⁻¹¹, que pueden ser evidenciados como micronúcleos o pequeños cuerpos extranucleares dentro de la célula. La exposición a agentes clastogénicos incrementa la frecuencia de micronúcleos, por lo tanto, los micronúcleos son indicadores de efectos genotóxicos y citotóxicos¹¹ ya que ellos evalúan el riesgo de cáncer debido a la exposición ocupacional a solventes. Los CBMN adicionalmente permiten medir otras anormalidades nucleares además de los micronúcleos que reflejan la inestabilidad genómica como los puentes nucleoplásmicos, un biomarcador de fusión de extremos teloméricos o reparación incorrecta del DNA, y los “nuclear buds” asociados con la amplificación del DNA y la resolución anómala de los complejos de DNA propios de la mitosis¹².

El CBMN ha demostrado que ciertos trabajadores rutinariamente expuestos a hexano, tolueno y benceno (como zapateros, trabajadores de refinerías de petróleo y personal que trabaja con fotocopiadoras)^{7,13-16} tienen daño genotóxico debido a la exposición a estas sustancias^{3,17}.

Además, durante la primera fase de su metabolismo, los solventes orgánicos inducen reacciones de oxidación mediadas por citocromo P450, y la enzima codificada por un gen cuyo polimorfismo ha sido asociado, no solo a la regulación transcripcional alterada y una expresión incrementada de ciertos genes, sino también con una frecuencia incrementada de las aberraciones cromosómicas y la susceptibilidad al cáncer¹⁸. Una de las variaciones genéticas más estudiadas es el polimorfismo de fragmento de restricción (RFLP) PstI/RsaI localizado en la región flanqueante 5' del gen. El alelo mutante (c2) ha sido asociado con la expresión alterada de la enzima¹⁹.

Por lo tanto, la caracterización genética de los trabajadores de los talleres de pintura de automóviles es importante para describir los posibles efectos tóxicos de la exposición a solventes orgánicos.

En Colombia, la exposición ocupacional a solventes constituye un problema de salud pública. La mayoría de los talleres de pintura de automóviles pertenecen al sector informal de la economía, lo que explica por qué sus trabajadores no siguen protocolos de bioseguridad o tienen servicios médicos orientados a la prevención de riesgos de salud. Adicionalmente, el bajo nivel escolar se refleja en la falta de conocimiento sobre las potenciales medidas de protección y las consecuencias de la exposición a solventes orgánicos sobre la salud. Es usual para estos trabajadores informales realizar los procesos de pintura bajo sus propios criterios, ignorando los estándares nacionales e internacionales de calidad. Además, su jornada laboral puede extenderse más allá de las ocho horas diarias que establece la ley colombiana, lo que incrementa los riesgos asociados a la exposición genotóxica. A pesar de que se han desarrollado algunos estudios en diversos países del mundo sobre este tópico, incluyendo Colombia^{20,23}, la relación entre los polimorfismos CYP2E1 y la presencia de micronúcleos en trabajadores de pintura de carros no ha sido examinada, lo que puede ser usado como un biomarcador de daño genotóxico y predictor de riesgo de cáncer. Por consiguiente, es necesario caracterizar la salud y condiciones de trabajo de individuos expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos usados en talleres de pintura automotriz en Bogotá, Colombia, para alertar sobre los posibles inicios de daño genético temprano, así como la identificación de los riesgos de generar problemas a largo plazo en la salud y tomar acciones preventivas que apuntan a la promoción de la salud. Para este fin, el comportamiento de la genotoxicidad y marcadores genéticos de susceptibilidad fue evaluada para sugerir medidas preventivas para minimizar la exposición y la probabilidad de presentar daño genotóxico.

Materiales y Métodos

Población de estudio

Este fue un estudio transversal con una población muestreada en Bogotá, Colombia. Esta muestra fue calculada de acuerdo con los resultados del estudio de 2007 de Heuser y colaboradores ⁴, quienes usaron la variable de índice de daño (Damage Index - DI) como una medida de daño genético, teniendo en comparación de medias de dos poblaciones con una varianza desconocida y con un poder estadístico estimado del 95%, considerando un 20% de pérdida. La muestra poblacional de individuos expuestos fue recogida en la localidad de Barrios Unidos, en talleres de pintura de carros, donde los controles sin exposición a solventes fueron obtenidos, exclusivamente, de una institución educativa en el mismo barrio. A partir del universo de la población expuesta, previamente establecidos con las autoridades locales, se realizaron visitas a propietarios y administradores de los talleres de pintura. Aquellos trabajadores que voluntariamente accedieron a participar fueron incluidos en el estudio hasta completar el tamaño de muestreo del grupo expuesto. Un proceso similar fue usado en la institución educativa para reclutar a los participantes del grupo de los individuos no expuestos. El grupo expuesto consistió en 62 hombres adultos trabajadores, ocupacionalmente expuestos a solventes por al menos los últimos cinco años, sin historia médica relevante (como cáncer, hepatitis B, tratamiento médico reciente o prolongado, o exposición previa a la radiación). Los participantes que eran consumidores regulares de tabaco o alcohol, que usaban cualquier tipo de drogas psicoactivas, o que tenían exposición extra ocupacional a solventes fueron excluidos. El grupo de no expuestos consistió en 60 individuos reclutados de la institución educativa, los cuales fueron seleccionados bajo los mismos criterios excepto la exposición a solventes. En ambos grupos los trabajadores consintieron compartir su información en aspectos personales, de salud y trabajo. Esto fue también verificado que, en esos talleres estudiados, los procesos involucrados en la mezcla y aplicación de pintura no ha sido alterados significativamente en los últimos 20 años. Un estudio piloto fue realizado con el 10% de las muestras antes de empezar la recolección de los datos, para estandarizar tiempos y acciones.

Recolección de datos

Un cuestionario fue diligenciado para cada trabajador, el cual incluía variables como edad, ocupación, fecha de empleo, hábitos de consumo de tabaco y alcohol, frecuencia y tiempo de exposición a solventes orgánicos e historia médica. El cuestionario fue incluido para evaluar síntomas neurotóxicos y con más de seis respuestas afirmativas, se determinaron como casos sospechosos. Este cuestionario fue aplicado directamente por los investigadores a cada uno de los participantes.

Ensayo de micronúcleos (CBMN)

La genotoxicidad como una medida del daño cromosómico en linfocitos humanos, fue determinada por el ensayo de micronúcleos por detención de la citocinesis (CBMN). Brevemente, a cada individuo le fue tomada una muestra de sangre de 5 mL el último día laboral de la semana. 500 µL de sangre fue añadida al medio de cultivo RPMI 1640, con el cual se establecieron dos cultivos celulares. Después de 44 horas, fue añadida citocalasina B a cada cultivo para detener la citocinesis. A las 72 horas de cultivo, las células fueron tratadas por cinco minutos con una solución hipotónica de KCl 0.075 M, y posteriormente prefijadas y fijadas con soluciones de metanol y ácido acético (3:5) y (5:1), respectivamente, para finalmente obtener cuatro láminas de cada cultivo, las cuales fueron teñidas con Giemsa. La frecuencia de micronúcleos, células micronucleadas, puentes microplásmicos y “nuclear buds” fueron analizados en 2,000 células binucleadas para cada una de las muestras ⁹.

Determinación del genotipo para CYP2E1

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida por los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) fueron usados para la determinación de polimorfismos genéticos de la enzima CYP2E1. El ADN fue amplificado con los iniciadores 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3' y 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3', y un fragmento de 410 bp fue obtenido. Para diferenciar entre el alelo c1 y el c2 en el genotipo de CYP2E1, el fragmento amplificado fue digerido con la endonucleasa de restricción RsaI a 37°C por una hora. Los fragmentos fueron separados usando un gel de agarosa al 2%. El genotipo homocigoto c1c1 corresponde a fragmentos de 360 y 50 bp. En el homocigoto c2c2 se observa el fragmento completo, de 410 bp, y en el heterocigoto c1c2 los tres fragmentos están presentes^{18,24}.

Análisis estadístico

Para minimizar la posible desviación en el muestreo, los resultados de los trabajadores expuestos y no expuestos, fueron pareados por grupos de edad. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Un análisis descriptivo fue realizado, determinando la frecuencia de las distribuciones y medidas de tendencia central y dispersión de acuerdo con los niveles calculados tanto en las variables de los trabajadores como en las biológicas. La distribución normal de los datos fue establecida usando Kolmogorov-Smirnov con un nivel de significancia del 10% ($p=0.10$). Las asociaciones entre la exposición ocupacional a los solventes orgánicos y las variables ocupacionales, los síntomas neurológicos y los biomarcadores genéticos, fueron evaluados con el test de independencia asintótico Ji-cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher e índices de probabilidad (valores esperados <5). El test no paramétrico Mann Whitney-Wilcoxon fue usado. Un modelo de regresión ordinal (generalized linear models, GLM) fue usado para evaluar ya fuera CYP2E1 y exposición ocupacional a solventes orgánicos, y como la interacción de esta exposición predice las cuatro variables de interés (es decir, micronúcleos, células micronucleadas, puentes nucleoplásmicos y

Tabla 1. Características demográficas y ocupacionales de los individuos participantes en este estudio

Variable	Expuestos (n= 62)		No-expuestos (n= 60)		p
	n	%	n	%	
Edad (años)					
<29	9	14.5	9	15.0	0.203*
30-39	11	17.7	19	31.7	
40-49	23	37.1	20	33.3	
50-59	13	21.0	11	18.3	
>60	6	9.7	1	1.7	
Exposición ocupacional					
Tíner	57	91.9	1	1.7	<0.001
Varsol	29	47.5	2	3.3	<0.001
Gasolina	33	54.1	5	9.1	<0.001
Acetona	7	11.5	1	1.7	0.062*
Pegante	31	51.7	1	1.7	<0.001
Pintura	51	82.3	0	0.0	<0.001
Solvente para pintura	50	82.0	0	0.0	<0.001
Desengrasante	43	70.5	1	1.7	<0.001
Limpiador	40	66.7	6	10.0	<0.001
Higiene y protección personal					
Uso de ropa de trabajo	47	75.8	7	12.1	<0.001*
Uso de guantes	38	61.3	5	8.6	<0.001
Uso de respirador	45	72.6	2	3.4	<0.001
Actividades realizadas en su tiempo libre					
Mecánica	6	9.7	2	3.3	0.273*
Carpintería	3	4.9	3	5.0	1.000*
Pintura	13	21.3	5	8.6	0.073*
Lavado	1	1.6	1	1.7	1.000*
Pintado de vidrio	1	1.6	0	0.0	1.000*
Cerámica	4	6.5	0	0.0	0.119*

* Test exacto de Fisher

Tabla 2. Síntomas reportados por los participantes en el estudio usando el cuestionario Q16.

Cuestionario Q16 de evaluación de manifestaciones neurológicas	Expuestos (n= 62)		No expuestos (n= 60)		p*
	n	%	n	%	
¿Es usted olvidadizo?	25	40.3	10	16.7	0.003
¿Se siente usted frecuentemente furioso sin razón?	19	40.3	3	5.0	< 0.001
¿Se despierta usted frecuentemente y después tiene problemas para volver a dormir?	24	38.7	11	18.3	0.011
¿Siente usted algunas veces presión en el pecho?	24	38.7	4	6.7	< 0.001
¿Siente a menudo punzadas dolorosas, entumecimiento u hormigueo en alguna parte del cuerpo?	21	33.9	7	11.7	0.003
¿Se siente inusualmente cansado?	19	30.6	7	11.7	0.009
¿Su familia le ha dicho que está distraído?	19	30.6	5	8.3	0.002
¿Se siente a menudo triste o deprimido sin razón?	18	27.0	1	1.7	< 0.001
¿Suele tener problemas para concentrarse?	17	27.4	5	8.3	0.005
¿Suele olvidar actividades que considera importantes?	12	19.4	2	3.3	0.005
¿Siente que ha perdido fuerza en brazos o piernas?	12	19.4	2	3.3	0.005
¿Ha sentido que se va a caer repentinamente al estar de pie o al caminar?	12	19.4	4	6.7	0.034
¿Le resulta difícil entender las noticias, programas o novelas que ve en la televisión o escucha en la radio?	11	17.7	0	0.0	< 0.001
¿Le resulta difícil decidirse a realizar actividades que sabe que debe realizar?	8	12.9	6	10.0	0.414
¿Ha perdido la sensibilidad en sus manos o pies?	5	8.1	2	3.3	0.233
¿Le resulta difícil apuntarse los botones?	5	8.1	0	0.0	0.031

* Test exacto de Fisher de una cola.

“nuclear buds”). Las frecuencias alélicas fueron calculadas y se comprobó si eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-WE) con tests asintóticos con el software STATA v.12.0²⁵. El nivel máximo de significancia fue 5% ($p < 0.05$).

Consideraciones éticas

Este estudio se acoge a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y a los estándares colombianos para investigación con humanos. El protocolo fue aprobado por los comités técnicos y éticos del Instituto Nacional de Salud y de la Universidad del Rosario en Bogotá, Colombia. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de realizar la entrevista y tomar las muestras biológicas.

Resultados

Ciento veintidós hombres trabajadores participaron en este estudio: 62 trabajadores de talleres de pintura automotriz expuestos a solventes y 60 no expuestos. Los trabajadores expuestos tenían una edad promedio de 43.9 ± 12.4 años y un tiempo de exposición promedio de 21 ± 11 años; por el otro lado, la edad promedio de los trabajadores no expuestos fue 40.1 ± 10.6 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.067$) para edad entre los dos grupos de trabajadores. Adicionalmente, el 39% ($n = 24$) de ellos trabajaban como pintores, 19% ($n = 12$) como mecánicos, 16% ($n = 10$) como reparadores de partes automotrices, 8% ($n = 5$) como coloristas, y el resto de ellos como trabajadores en áreas administrativas (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas para las variables de exposición ocupacional e higiene y elementos de protección, siendo mayores para el grupo expuesto.

Los elementos de protección personal para la piel reportados por los trabajadores fueron uniformes en un 75% (47), seguidos por ropa de diario en un 22% (14). Con respecto a los guantes, 28% dice que usan guantes de nitrilo y un porcentaje igual de caucho. El porcentaje restante de trabajadores no usa guantes. De los 45 trabajadores que usan respirador, 8% (4) lo usan con filtro y 35% (16) con doble filtro. Con respecto al tipo de filtro, en el 17% (8) fue un filtro impermeable a vapores orgánicos mientras que el porcentaje restante utiliza tapabocas (máscara facial), un implemento que no provee adecuada protección respiratoria.

Con respecto a la variable de fumadores, 31% (19) de los expuestos y 48% (29) de los no expuestos nunca habían fumado, mientras que, al momento del muestreo, 20% (13) de los expuestos y de los no expuestos (12) fumaban. No se encontró diferencia significativa entre los dos grupos ($p = 0.102$).

Tabla 3. Polimorfismos de *CYP2E1* como biomarcadores de susceptibilidad por exposición ocupacional de solventes orgánicos.

Grupo	<i>CYP2E1</i>						total
	c1/c1		c1/c2		c2/c2		
	n	%	n	%	n	%	
Expuestos	45	72.6	15	24.2	2	3.2	62
No expuestos	40	67.8	16	27.1	3	5.1	59
Total	85	70.2	31	25.6	5	4.1	121

Tabla 4. Distribución de las medidas de los biomarcadores por CBMN por exposición ocupacional a solventes orgánicos.

	Cohortes				
		Expuestos		No expuestos	
		No.	%	No.	%
Frecuencia de micronúcleos	0	18	29.0	23	38.3
	1	14	22.6	17	28.3
	2	13	21.0	6	10.0
	≥3	17	27.4	14	23.3
Frecuencia de células micronucleadas	0	18	29.0	23	38.3
	1	16	25.8	21	35.0
	2	19	30.6	6	10.0
	≥3	9	14.5	10	16.7
Frecuencia de puentes nucleoplásmicos	0	41	66.1	51	85.0
	1	8	12.9	5	8.3
	2	8	12.9	1	1.7
	≥3	5	8.1	3	5.0
Frecuencia de "nuclear buds"	0	52	91.2	54	90.0
	1	4	7.0	5	8.3
	2	0	0.0	1	1.7
	≥3	1	1.8	0	0.0

La presencia de manifestaciones clínicas fue examinada entre el grupo expuesto y el no expuesto (Tabla 2). Los síntomas incluidos en el cuestionario Q16 fueron significativamente superiores en el grupo expuesto cuando fue comparado con el no expuesto en 14 de los 16 síntomas. El número de síntomas variaba entre 0 y 13, la media fue significativamente mayor en el grupo expuesto que en el no expuesto (4 vs. 0, $p < 0.001$, test exacto de una cola de Mann Whitney-Wilcoxon). El porcentaje de personas con más de seis síntomas fue significativamente más alto en el grupo de expuestos que en el de no expuestos (17.7% vs. 3.3%, $p = 0.009$). Adicionalmente, 6% (4) reportaron haberse intoxicado al menos una vez con solventes. De los resultados del cuestionario Q16, 32% (20) de los expuestos y 5% (3) de los no expuestos presentaron más de seis síntomas.

Las frecuencias alélicas de *CYP2E1* se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0.331$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la caracterización de los genotipos del polimorfismo *CYP2E1* en los dos grupos ($p = 0.749$, test de razón de verosimilitud exacta). Solamente una muestra de sangre del grupo de no expuestos no pudo ser procesada (Tabla 3).

Cuando se compararon las características evaluadas en el CBMN, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos tanto para las frecuencias de las células micronucleadas como para los puentes nucleoplásmicos (los valores p para la razón de probabilidad exacta fueron 0.042 y 0.046, respectivamente) siendo mayores en el grupo expuesto. Para las frecuencias de micronúcleos y "nuclear buds" no se encontraron diferencias significativas (los valores p para la razón de probabilidad exacta fueron 0.296 y 0.933, respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 5. Ordinal regression's models for the interaction of *CYP2E1* polymorphisms with occupational exposure to organic solvents and its association with the frequency of micronuclei and micronucleated cells

Frecuencia de micronúcleos	Estima	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
EXP=+ * [CY2pe1= c1c1]	1.287	0.013	0.273	2.301
[EXP=+ * [CY2pe1= c2c2/c1c2]	-0.857	0.218	-2.222	0.507
[EXP=-] * [CY2pe1= c1c1]	0.764	0.139	-0.247	1.775
[EXP=-] * [CY2pe1= c2c2/c1c2]	0			
Frecuencia de células micronucleadas				
[EXP=+ * [CY2pe1= c1c1]	1.272	0.015	0.252	2.292
[EXP=+ * [CY2pe1= c2c2/c1c2]	-0.974	0.165	-2.349	0.401
[EXP=-] * [CY2pe1= c1c1]	0.603	0.244	-0.411	1.618
[EXP=-] * [CY2pe1= c2c2/c1c2]	0			
Nucleoplasmic bridges				
[EXP=+ * [CY2pe1= c1c1]	1.047	0.126	-0.293	2.387
[EXP=+ * [CY2pe1= c2c2/c1c2]	-20.113	-	-20.113	-20.113
[EXP=-] * [CY2pe1= c1c1]	-0.361	0.640	-1.875	1.153
[EXP=-] * [CY2pe1= c2c2/c1c2] *	0			
Frecuencia de puentes nucleoplásmicos				
[EXP=+ * [CY2pe1= c1c1]	-0.080	0.930	-1.878	1.717
[EXP=+ * [CY2pe1= c2c2/c1c2]	-0.490	0.703	-3.008	2.027
[EXP=-] * [CY2pe1= c1c1]	-0.031	0.973	-1.831	1.769
[EXP=-] * [CY2pe1= c2c2/c1c2] *	0			

*Categoría de referencia

Individuos heterocigotos (c1c2) fueron agrupados con los homocigotos (c2c2) en la determinación del efecto de cada genotipo *CYP2E1* en el daño cromosómico debido al bajo número de individuos con el genotipo homocigoto. Las diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas en la interacción entre el genotipo c1c1 y la exposición ocupacional a solventes orgánicos, con altas frecuencias de micronúcleos y células micronucleadas (Tabla 5). No se encontraron asociaciones significativas para las frecuencias de puentes nucleoplásmicos y “nuclear buds”.

Discusión

La exposición a solventes orgánicos puede causar serios problemas de salud, incluyendo intoxicación o carcinogénesis, especialmente cuando el benceno está involucrado. El biomonitorio de poblaciones humanas ocupacionalmente expuestas a estos químicos es esencial para identificar efectos biológicos tempranos y prevenir la ocurrencia de complicaciones crónicas asociadas ²⁶.

Este estudio evaluó los efectos genotóxicos por exposición a solventes orgánicos en una muestra de trabajadores rutinariamente expuestos a solventes orgánicos debido a actividades laborales asociadas con la pintura de carros, y trabajadores no expuestos a esos agentes. El promedio de edad observado en ambos grupos fue como los que se encuentran en los informes disponibles de la población laboral activa en Colombia y en otros estudios de poblaciones con trabajos similares ²⁷. Por el otro lado, es importante mostrar que el tiempo de exposición para el grupo expuesto fue de aproximadamente 21 años, y adicionalmente, algunos de ellos realizan actividades relacionadas con actividades de pintura en sus tiempos libres. Estos hechos demuestran que ellos estaban crónicamente expuestos a químicos, específicamente hidrocarburos aromáticos, que pueden causar efectos en la salud a largo plazo, como se ha reportado en estudios previos ²⁸.

En el uso de protección personal, presumiblemente tanto empleadores como trabajadores carecían del conocimiento relacionado con los efectos nocivos de estos agentes, ya que el grupo expuesto claramente no usaba la protección básica como ropa de trabajo, guantes y respiradores. Esta situación presenta la dificultad adicional a que tan solo el 17% usan guantes de nitrilo, el

cual es el material recomendado en las hojas de seguridad de estos productos. Con respecto a la protección respiratoria, el escenario no es diferente, debido a que sólo el 32% usan un respirador con filtro y, aún más alarmante, sólo el 12% usan un filtro apropiado para vapores orgánicos. Las condiciones anteriores son preocupantes, especialmente porque estas ya han sido consistentemente descritas en otras poblaciones también expuestas a los solventes orgánicos ²⁷.

La manifestación de desórdenes emocionales y del humor, así como desórdenes de memoria en el trabajo y a corto plazo, han sido asociadas a la exposición crónica a solventes ²⁹. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos y no expuestos, fueron relacionadas a algunos síntomas incluidos en el cuestionario Q16 como ser olvidadizos, sentir rabia sin ninguna razón, sentir presión en el pecho, tener problemas de concentración, sentirse tristes o deprimidos sin ninguna razón, entre otros ³⁰. Adicionalmente, un tercio de los expuestos (32%) reportaron más de seis síntomas incluidos en ese cuestionario, lo que sugiere riesgo de neurotoxicidad.

Con respecto a la genotoxicidad evaluada a través de CBMN, diferencias significativas fueron observadas entre expuestos y no expuestos, específicamente en las frecuencias de células micronucleadas y puentes nucleoplásmicos, indicando el alto grado de genotoxicidad que puede ser atribuida al uso de solventes orgánicos en la preparación de pintura para carros. Vale la pena mencionar que los CBMN expresan el daño acumulado en el DNA asociado con la exposición crónica como la encontrada en el grupo expuesto. Este daño acumulado dentro de los linfocitos por largos periodos, los convierten en centinelas que permite la identificación de la genotoxicidad, especialmente a través de análisis como estos, lo que los convierte en uno de los tests citogenéticos estándar en el campo de la genética toxicológica ¹¹. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en estudios previos de exposición ocupacional a genotóxicos ^{12,31}.

Por el otro lado, la superfamilia citocromo P450 está involucrada en reacciones metabólicas de activación; sin embargo, además de con detoxificación están relacionadas con activación metabólica en procarcinógenos ³². Los polimorfismos de CYP2E1 se constituyen como importantes cuando se analizan biomarcadores citogenéticos, debido a que este gen es el más abundante en linfocitos ³³. El alelo c2 de CYP2E1 altera la expresión génica, elevando los niveles de proteína y disminuyendo la actividad basal de esta, cuando se compara con el homocigoto c1c1 ^{24,34}. Con respecto a los biomarcadores tanto de susceptibilidad como de efecto temprano, nuestros resultados son consistentes con otros estudios en los cuales fue establecido que el genotipo c1c1 está asociado al incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a solventes orgánicos ²⁸. A pesar de que no se han encontrado diferencias en la actividad basal de las dos variantes de la enzima (c1 y c2), la variante c2 muestra ser más sensible al daño por la interacción con sustancias como isoniazidas, lo que sugiere que el genotipo c1c1 es menos sensible al daño, y por lo tanto explica por qué genera más radicales libres bajo la misma exposición, lo que implica un incremento en el número de alteraciones cromosómicas que puede ser expresadas en la formación de micronúcleos ³⁵. La presencia de micronúcleos por otro lado, está asociada con los puentes nucleoplásmicos y como se ha mostrado en trabajos previos la presencia de micronúcleos incrementa el riesgo de puentes nucleoplásmicos ³⁵. Bajo esta situación, el número de micronúcleos puede ser entre dos y diez veces mayor que el número de puentes nucleoplásmicos y hasta cien veces mayor que el número de “nuclear buds”.

Nuestro estudio debe motivar el fortalecimiento de las acciones orientadas a la prevención y control del riesgo por parte de los empleados y gestores de riesgos laborales para promover la vigilancia epidemiológica ocupacional más activa, que busque proteger a los trabajadores. Hemos identificados fallas inaceptables en las medidas básicas de protección que deben observar los trabajadores expuestos a agentes cancerígenos como los solventes orgánicos contenidos en la pintura de automóviles. Nuestros resultados también apoyan el desarrollo de más estudios para consolidar los hallazgos relacionados con el efecto de susceptibilidad ejercido por el genotipo c1c1 del polimorfismo CYP2E1.

Nuestro estudio tiene ciertas limitaciones debido a su diseño metodológico, como el hecho de que sólo pudimos establecer asociaciones no causales, y que puede presentarse un sesgo de memoria en los trabajadores durante la recolección de datos relacionado con los nombres de los solventes que han usado. Los trabajadores con síntomas más graves podrían ser más propensos a pensar más detenidamente y con más detalle sobre los disolventes que utilizaron en comparación con aquellos con síntomas menos graves. Debido a que los trabajadores tuvieron que laborar con solventes durante al menos 5 años para ser incluidos como “expuestos” en el estudio, la variabilidad en recordar el nivel de exposición entre aquellos en el grupo expuesto probablemente no haya impactado los resultados en las asociaciones entre solventes orgánicos y efectos genotóxicos.

De acuerdo con los resultados del estudio, y con las recomendaciones de la Guía 2015 para la Seguridad y Salud Integral en el Lugar de Trabajo para trabajadores expuestos al benceno y sus derivados, sugeriríamos que los empleadores de trabajadores expuestos a solventes orgánicos, especialmente aquellos que laboran en pintura automotriz, pueden educar a sus empleados sobre los efectos nocivos de estas sustancias y cómo protegerse a sí mismos mediante capacitación en procesos seguros y en el uso de equipo de protección personal, normas de seguridad y controles de ingeniería y administrativos²⁹.

Cabe señalar que, debido al efecto sinérgico entre el tabaquismo y la exposición a solventes orgánicos²⁹, es necesario implementar estrategias que conduzcan a la eliminación de esta práctica y la promoción de estilos de vida saludables. En cuanto a las fallas detectadas en el uso de protección personal, es importante establecer un programa técnico para la selección y manejo de respiradores aprobados, así como protección de piel y ojos, según el tipo de exposición que se identifique en el puesto de trabajo²⁹.

La muestra de nuestro estudio es parte de una población que está expuesta ocupacionalmente a solventes orgánicos que pueden causar intoxicaciones crónicas; por lo tanto, es imperativo establecer programas de vigilancia epidemiológica ocupacional que incluyan a todos los trabajadores. Estos programas deben ir acompañados de evaluaciones periódicas, que incluyan la historia clínica y ocupacional completa, así como los resultados de hemogramas y biomarcadores recomendados por la ACGIH. Esto permitirá detectar cambios menores debidos a la exposición a solventes orgánicos de manera oportuna²⁹.

Conclusiones

Los trabajadores expuestos a solventes orgánicos con polimorfismos de CYP2E1, específicamente con genotipo c1c1, tienen mayor probabilidad de presentar mutaciones en las células somáticas, condición asociada con una mayor susceptibilidad a enfermedades como el cáncer. Encontramos diferencias significativas entre expuestos y no expuestos en las frecuencias de células micronucleadas y puentes nucleoplásmicos; estas mostraron alto grado de genotoxicidad atribuida al uso de solventes orgánicos en la preparación de pintura para carros.

En cuanto a los síntomas incluidos en el cuestionario Q16 fueron significativamente superiores en el grupo expuesto sugiriendo riesgo de neurotoxicidad. Esto esta en concordancia con la identificación de fallas en las medidas básicas de protección que deben tener los trabajadores expuestos a agentes cancerígenos como los solventes orgánicos.

Referencias

1. Environmental Protection Agency. Hazardous waste management system; identification and listing of hazardous waste; paint production wastes. EPA; 2001; 66(30). Available from: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2001-02-13/pdf/01-3087.pdf>
2. Costa C, Pasquale RD, Silvani V, Barbaro M, Catania S. In Vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol in Vitro*. 2006; 20(3): 24-331. Doi: 10.1016/j.tiv.2005.08.

3. Mattia C, Lebel C, Bondy S. Effect of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42:879-882. DOI: 10.1016/0006-2952(91)90048-A
4. Heuser V. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect and susceptibility. *Toxicology*. 2007; 10:1-13. DOI: 10.1016/j.tox.2007.01.011
5. Bonassi S, Neri M, Puntoni R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res*. 2001; 480-481:349-358. DOI: 10.1016/s0027-5107(01)00194-4
6. Swanepoel AJ. Evaluation of DNA damage and DNA repair by the comet assay in workers exposed to organic solvents. M.Sc. Thesis. North-West University, Potchefstroom Campus, 2004. Available from: <http://hdl.handle.net/10394/1482>
7. Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat Res*. 2001; 491:173-181. DOI: 10.1016/s1383-5718(01)00141-3
8. IARC (International Agency for Research on Cancer). Occupational exposure as a painter. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans IARC. 2010; 98:509-539. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol98/mono98-6.pdf>
9. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 2003; 534:65-75. DOI: 10.1016/s1383-5718(02)00249-8
10. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26(1):43-49. DOI: 10.1093/mutage/geq050
11. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and ADN damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 1999; 14(6):605-612. DOI: 10.1093/mutage/14.6.605
12. Nersesyan A, Fenech M, Bolognesi C, Misík M, Setayesh T, Wultsch G, et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage causes by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutat Res*. 2016; 770:1-11. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.05.003
13. Heuser V, Moraes V, Da Silva J, Erdtmann B. Comparison of genetic damage in Brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. *Mutat Res*. 2005; 583(1):85-94. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.03.002
14. Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. Evaluation of ADN damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res*. 1999; 441:115-127. DOI: 10.1016/s1383-5718(99)00042-x
15. Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Mendez J, et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res*. 2006; 604:19-27. DOI: 10.7705/biomedica.4289
16. Iravathy K, Shankarappa K, Vijayashree B, Prabhakar K, Ahuja YR. DNA damage and repair studies in individuals working with photocopying machines. *IJHG*. 2001; 1(2):139-143. Doi: 10.1080/09723757.2001.11885749
17. Sul D, Lee E, Lee MY, Kang SK. ADN damage in lymphocytes of benzene exposed workers correlates with trans, trans-muconic acids and breath benzene levels. *Mutat Res*. 2005; 582:61-70. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.12.011
18. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J. Biochem*. 1991; 110:559-565. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123619
19. Bolt HM, Roos PH, Their R. The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003; 76:174-185. DOI: 10.1007/s00420-002-0407-4
20. Hoyos-Giraldo LS, Escobar-Hoyos LF, Saavedra-Trujillo D, Reyes-Carvajal I, Muñoz A, Londoño-Velasco E, et al. Gene-specific promoter methylation is associated with micronuclei frequency in urothelial cells from individuals exposed to organic solvents and paints. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2016; 26(3):257-262. doi: 10.1038/jes.2015.28
21. Londoño-Velasco E, Martínez-Perafán F, Carvajal-Varona S, García-Vallejo F, Hoyos-Giraldo LS. Assessment of DNA damage in car spray painters exposed to organic solvents by the high-throughput comet assay. *Toxicol Mech Methods*. 2016; 26(4):238-242. DOI: 10.3109/15376516.2016.1158892

22. Villalba-Campos M, Chuairé-Noack L, Sánchez-Corredor MC, Rondón-Lagos M. High chromosomal instability in workers occupationally exposed to solvents and paint removers. *Mol Cytogenet.* 2016; 9:46. DOI 10.1186/s13039-016-0256-6
23. Villalba-Campos M, Ramírez-Clavijo SR, Sánchez-Corredor MC, Rondón-Lagos M, Ibáñez-Pinilla M, Palma RM, et al. Quantification of cell-free DNA for evaluating genotoxic damage from occupational exposure to car paints. *J Occup Med Toxicol.* 2016; 11:33. DOI: 10.1186/s12995-016-0123-8
24. Guo YM, Wang Q, Liu YZ, Chen HM, Qi Z, Guo QH. Genetic polymorphisms in cytochrome P4502E1, alcohol and aldehyde dehydrogenases and the risk of esophageal squamous cell carcinoma in Gansu Chinese males. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(9):1444-1449. doi: 10.3748/wjg.14.1444
25. Cleves MA. Hardy-Weinberg Equilibrium Tests and Allele Frequency Estimation. *STATA Technical Bulletin.* No. 48. March 1999, 34-37. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.153981
26. Varona M, Narváez D, Groot H, Combariza D. Biomarcadores y genotoxicidad. En: Rodríguez C. *Toxicología ocupacional.* 1ª ed. Bogotá: Sociedad Colombiana de Medicina del Trabajo; 2013. P.307-29.
27. Torres C, Varona M, Lancheros A, Patiño R, Groot H. Evaluación del daño en el ADN y vigilancia biológica de la exposición laboral a solventes orgánicos. *Biomédica.* 2008; 28:126-38. doi: 10.7705/biomedica.v28i1.115
28. Hoyos-Giraldo LS, Carvajal S, Cajas-Salazar N, Ruiz M, Sánchez-Gómez A. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res.* 2009; 666(1-2):8-15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.03.003
29. Ministerio de Trabajo. Recomendaciones Guía de atención integral de Seguridad y Salud en el Trabajo para trabajadores expuestos a benceno y sus derivados. Bogotá: Ministerio de Trabajo. 2015. Available from: https://www.mintrabajo.gov.co/web/guest/relaciones-laborales/comision-permanente-de-concertacion/-/document_library/mRRfCPNbtph/view_file_/60364
30. Harrison RJ, Roisman R. Disolventes. En: Ladou J, Harrison R. *Diagnóstico y tratamiento en medicina laboral y ambiental.* 5 ed. Mexico, D.F: Editorial El Manual Moderno; 2015. P.524-56.
31. León-Mejía G, Espitia-Pérez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Pêgas HJA, et al. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci Total Environ.* 2011;409(4):686-691. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.10.049
32. Ulusoy G, Arinç E, Adali O. Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. *Arch Toxicol.* 2007; 81(10):711-18. DOI: 10.1007/s00204-007-0200-y
33. Dahlström V, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, da Silva J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology.* 2007; 232(3):235-47. DOI: 10.1093/mutage/gen031
34. Tsutsumi M, Wang JS, Takase S, Takada A. Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P4502E1 in patients with different P450 2E1 genotypes. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1994; 29:29-32.
35. Atkinson AJ Jr, Markey SP. Biochemical mechanisms of drug toxicity. Chapter 16. In: Atkinson AJ Jr, Huang S-M, Lertora JLL, Markey SP. *Principles of Clinical Pharmacology.* Academic Press. 2012.
36. Cheong HSJ, Seth I, Joiner MC, Tucker JD. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis.* 2013; 28:433-440. doi: 10.1093/mutage/get020