

Efecto genotóxico de las mezclas complejas de hidrocarburos en trabajadores de estaciones de servicio de gasolina

Genotoxic effect of complex hydrocarbon mixtures in workers gasoline service stations

Henry J. González Torres¹, Alberto Moreno Rossi², Milton Quintana Sosa³

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto genotóxico de las mezclas complejas de hidrocarburos en los trabajadores de estaciones de servicio de gasolina en Barranquilla (Atlántico, Colombia) a través de la prueba Cometa (CA) alcalina.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio transversal, prospectivo inferencial de casos y controles. El grupo control estuvo conformado por 15 personas no expuestas laboralmente a hidrocarburos y el expuesto por 38 personas que trabajaron al menos 1 año como despachador de combustible. Se realizó un ensayo cometa alcalino en sangre venosa. Se determinó el efecto genotóxico utilizando el porcentaje de ADN en la cola y por Unidades Arbitrarias de daño. La comparación entre grupos se realizó por la prueba t-student o W-Wilcoxon. Los datos fueron modelados con una regresión simple ajustada. Los análisis de datos fueron realizados con el paquete estadístico R.

Resultados: Las edades de los grupos control y experimental fueron de 33 ± 9 y 38 ± 10 años, respectivamente; no hubo diferencia estadísticamente significativa para esta variable ($t = -1.82$; $p\text{-valor} \geq 0,05$; $\alpha = 95\%$). Hubo asociación entre Edad y Tiempo de Exposición ($\chi^2 = 24.9$; $p\text{-valor} < 0,05$; $\alpha = 95\%$). El %ADN en la cola para el grupo control fue de $20,67 \pm 25,79$, mientras que para el grupo expuesto fue $53,35 \pm 40,28$. El modelo de degradación de ADN es « $y = \sqrt{(512,687 + 733,899 \sqrt{t})}$ ».

Conclusiones: Las mezclas complejas de heterocíclicos son potencialmente genotóxicas. El daño progresivo se encuentra al 80 % después de 6 años de exposición, siendo igual a los 9 años de exposición que a los 15.

Palabras clave: daño del ADN, mutagénesis, hidrocarburos, compuestos policíclicos, Prueba Cometa.

¹ Universidad del Atlántico. Barranquilla (Colombia). Coordinador de Investigación Programa de Medicina, Universidad Simón Bolívar. Barranquilla (Colombia). henryjgonzaleztorres@gmail.com; hgonzalez11@unisimonbolivar.edu.co

² Profesor Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico. Barranquilla (Colombia). albertomoreno@mail.uniatlantico.edu.co

³ Jefe Unidad de investigación, desarrollo tecnológico e innovación en Genética y Biología Molecular, Universidad Simón Bolívar. Barranquilla (Colombia). mquintana2@unisimonbolivar.edu.co

Correspondencia: Henry J. González Torres. Departamento de Medicina, Universidad Simón Bolívar, Cra. 59 n° 59-65. Barranquilla (Colombia). +57 5 3444333 ext. 266.+57 301 565 7574. hgonzalez11@unisimonbolivar.edu.co. henryjgonzaleztorres@gmail.com

Fecha de recepción: 15 de agosto de 2014
Fecha de aceptación: 15 de octubre de 2014

Salud Uninorte
Vol. 31, N° 1, 2015
ISSN 0120-5552

<http://dx.doi.org/10.14482/sun.30.1.4309>

Abstract

Objective: To evaluate the genotoxic effects of complex mixtures of hydrocarbons in gasoline stations's workers in Barranquilla (Atlántico, Colombia) using the alkaline Comet Assay (CA).

Materials and methods: Study was transversal, prospective inferential of case and control. The controls were 15 persons without occupationally exposed to hydrocarbons and the exposed were 38 persons that were working at least one year as fuel dispenser. The alkaline Comet Assay was performed on venous blood. Genotoxic effects was determined through DNA percentage in tail and damage Arbitrary Units. The comparison between groups was performed by t-student or W-Wilcoxon test. The data were modeled with a simple regression adjusted. The data analyses were performed with the statistical package R.

Results: Age of control and experimental groups were 33 ± 9 and 38 ± 10 years respectively, there was no statistically significant difference for this variable ($t = -1.82$; $p\text{-value} \geq 0.05$; $\alpha = 95\%$). There was an association between Age and Exposure Time ($\chi^2 = 24.9$; $p\text{-value} < 0.05$, $\alpha = 95\%$). The %DNA tail for the control group was 20.67 ± 25.79 , while for the exposed group was 53.35 ± 40.28 . The DNA degradation model is « $y = \sqrt{(512.687 + 733,899 \sqrt{(t)})}$ ».

Conclusions: The complex mixtures of heterocyclic are potentially genotoxic. As the progressive damage is 80 % after 6 years of exposure, being equal damage to the 9 to 15 years of exposure.

Keywords: DNA damage, mutagenesis, hydrocarbons, polycyclic compounds, comet assay.

INTRODUCCIÓN

El avance de la industrialización ha generado un incremento de las enfermedades asociadas al entorno laboral y al ambiente, por lo cual los estudios de estas patologías, en sus aspectos epidemiológicos y etiológicos, han conducido a la identificación de factores ambientales y ocupacionales implicados en su origen celular y molecular (1, 2).

Muchas de las enfermedades relacionadas con la ocupación laboral no manifiestan sintomatología sino cuando ya han entrado en la etapa en que dicho proceso es crónico (2, 3). Un alto porcentaje de trabajadores afectados por algún tipo de enfermedad respiratoria relacionada con la ocupación se encuentra sin tratamiento, debido a que el cuadro clínico que presentan puede simular una infección aguda, e incluso presentarse sin sintomatología respiratoria asociada (4, 5).

El estudio del efecto de las mezclas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) derivados del petróleo se ha convertido en gran interés para la salud pública, ya que se han encontrado relaciones entre estos compuestos y algunas patologías de origen mutagénico y carcinogénico (6-8). Esta descarga y liberación de los PAHs se hace más notoria en los centros urbanos, donde debido a sus altas emisiones se altera la capacidad normal de amortiguación de sus efectos por parte del aire, lo cual afecta notoriamente su calidad. De esta forma, sumando factores ambientales e industriales se generan mezclas complejas que producen estrés oxidativo al nivel molecular, lo cual implica un aumento en el volumen del daño primario que hace poco probable el éxito en la acción de los mecanismos de reparación del ADN que posee la célula (9-12).

Existen diversas técnicas para evaluar los efectos de la genotoxicidad ambiental que permiten en gran medida un diagnóstico

preventivo y que han sido ampliamente utilizadas y recomendadas para determinar el posible daño de las mezclas de PAHs a nivel del ADN (13). Entre las más destacadas se encuentran las técnicas de los microsatélites (STRs), el test de Ames (TA), los ensayos *in vitro* de linfocitos (micronúcleos [MN]) y la electroforesis en gel de células individuales o Prueba Cometa (CA). Esta última técnica ha sido ampliamente utilizada porque permite observar y cuantificar el daño primario de la degradación del material genético (14-17).

En las ciudades algunos lugares de trabajo están expuestos directamente a los vapores de los HPAs; por ejemplo, las estaciones de despacho de gasolina.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto genotóxico de las mezclas complejas de PAHs en los trabajadores de estaciones de servicio de gasolina en la ciudad de Barranquilla (Atlántico, Colombia) a través de la Prueba Cometa alcalina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de corte transversal y prospectivo inferencial en la ciudad de Barranquilla. La población de estudio comprendió dos grupos: uno control (Grup_Ctrl) y otro de sujetos expuestos (Grup_Exp). El Grup_Ctrl estuvo compuesto por quince personas que no hubieran estado expuestas laboralmente a PHAs y el Grup_Exp por treinta y dos personas que han estado laborando como despachadores en una estación de servicio por lo menos un año. Para ambos grupos se tuvieron en cuenta para la inclusión restricciones tales como ausencia de tratamiento fármaco-terapéutico menor a cuatro meses, exposición a rayos X menor

a un año, consumo de licor menor a quince días y consumo de sustancias psicoactivas.

Posterior a la información del objetivo de estudio y firma del consentimiento informado, a los sujetos objeto de estudio se les aplicó una encuesta detallada elaborada de acuerdo con el protocolo publicado por The Internacional Comisión for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (18). Una vez diligenciada la encuesta se tomó una muestra de sangre periférica por punción venosa utilizando heparina como anticoagulante.

La CA se realizó de acuerdo con la metodología versión alcalina descrita por Singh et al. (1988) (19). La sangre heparinizada fue diluida con buffer fosfato salino (PBS). Esta se depositó en un portaobjeto cubierto con gel de agarosa. Los portaobjetos fueron incubados en un buffer alcalino ($\text{pH} > 10$), preparado con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) e hidróxido de sodio (NaOH) por 20 minutos. El corrido de la electroforesis fue a 25 voltios (V) y 300 miliamperios (mA) por 20 minutos, a 5° centígrados, con una relación de voltaje/distancia (V/cm) entre 0.7-1.0 V/cm. Los portaobjetos fueron coloreados con bromuro de etidio (BrdU) y revisados en un microscopio de fluorescencia.

Las placas fueron codificadas y las imágenes de los cometas fotografiadas y analizadas con el programa OpenComet (14). Los parámetros para hacer la comparación entre grupos fueron las unidades arbitrarias de daño en porcentaje y tiempo y el porcentaje de ADN de la cola (%DNA Tail). Para probar si las muestras provienen de poblaciones con la misma varianza se utilizó la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett. Para comparar la

heterogeneidad de los dos grupos se realizó la prueba U de Mann-Whitney. Se realizó una regresión simple (modelo ajustado) para determinar el modelo y estimar el nivel de daño (y) por cada trienio de exposición (x). Los análisis de datos fueron realizados con el programa estadístico R (20).

RESULTADOS

La edad del Grup_Ctrl fue 33 ± 9 años y la del Grup_Exp fue de 38 ± 10 años. No se encontró diferencia estadística entre las edades entre el Grup_Ctrl y Grup_Exp ($t = -1.82$; $p\text{-valor} \geq 0,05$; $\alpha = 95\%$) y las varianzas de las misma ($F = 0.74$; $p\text{-valor} \geq 0,05$; $\alpha = 95\%$). En el Grup_Exp el 6% (2 participantes) fueron del género femenino y se guardó el mismo porcentaje para el Grup_Ctrl (1 participante).

El tiempo promedio de exposición laboral fue de 11 ± 7 años. Teniendo en cuenta la organización por trienios acumulados, la mayor frecuencia se presentó para el trienio 12-15 años (26 % del Grup_Exp). Al realizar el cruce con las tablas de Etapas del Desarrollo Humano se encontró que 65 % de la población eran adultos jóvenes. Se encontró asociación entre Edad y Tiempo de Exposición ($\chi^2 = 24.9$; $p\text{-valor} < 0,05$; $\alpha = 95\%$).

Tabla 1. Clasificación del Tiempo de Exposición en Trienios

Trienio	Frec. Obs	Rep. %	% Acum.
1º trienio (1 – 3 años]	2	5 %	5 %
2º trienio (3 – 6 años]	4	11 %	16 %
3º trienio (6 – 9 años]	9	24 %	39 %
4º trienio (9 – 12 años]	6	16 %	55 %
5º trienio (12 – 15 años]	10	26 %	82 %
6º trienio (más de 15 años]	7	18 %	100 %
Total	38	100 %	–

Fuente: datos del estudio.

El porcentaje de ADN en la cola, que se traduce como porcentaje de ADN dañado, fue de $20,67 \pm 25,79$ para el Grup_Ctrl y de $53,35 \pm 40,28$ para el Grup_Exp. De acuerdo con los criterios clasificación de daño de Collin (22) y Speit y Hartmann (23), el Grup_Ctrl estuvo en las tres primeras clases de daño, en las que se alcanza el 84.7 % del total de células analizadas, mientras que para el Grup_Exp la asíntota comienza a crecer en la tercera y cuarta clase de daño (% ADN en la cola). Es de observar que solo el 17.2 % de las células revisadas en el Grup_Exp correspondió a células sin daño.

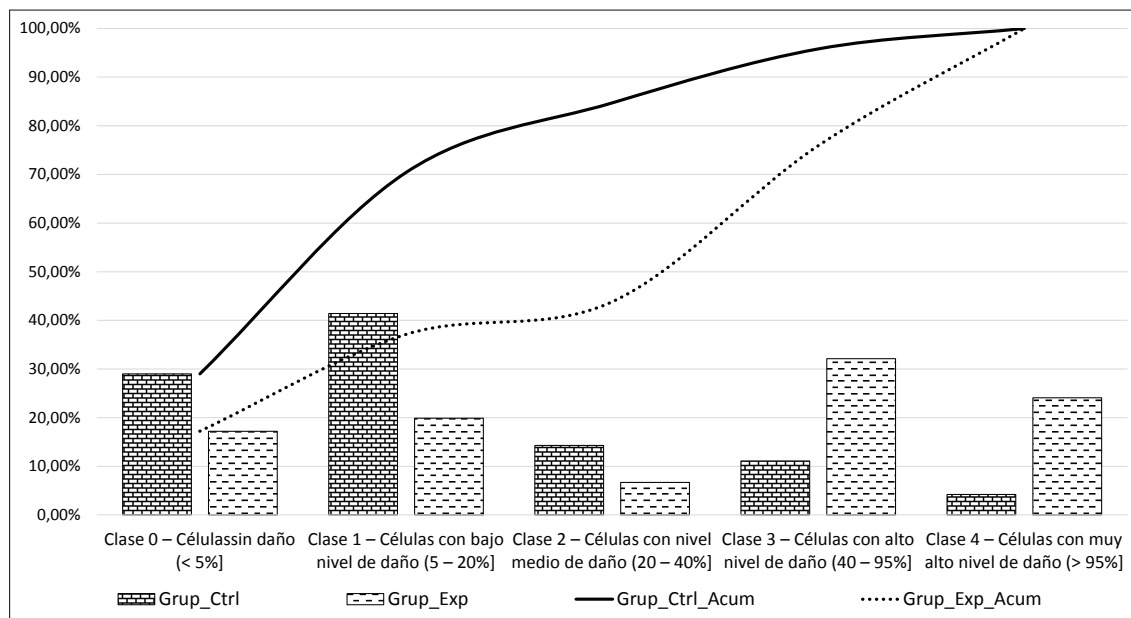
Tabla 2. Clasificación de Cometas por nivel de daño

Tipo de Daño	Grup_Ctrl	Grup_Exp
Clase 0 – Células sin daño (< 5%]	29.0%	17.2%
Clase 1 – Células con bajo nivel de daño (5 – 20%]	41.4%	19.9%
Clase 2 – Células con nivel medio de daño (20 – 40%]	14.3%	6.7%
Clase 3 – Células con alto nivel de daño (40 – 95%]	11.1%	32.1%
Clase 4 – Células con muy alto nivel de daño (> 95%]	4.2%	24.1%

Fuente: datos del estudio.

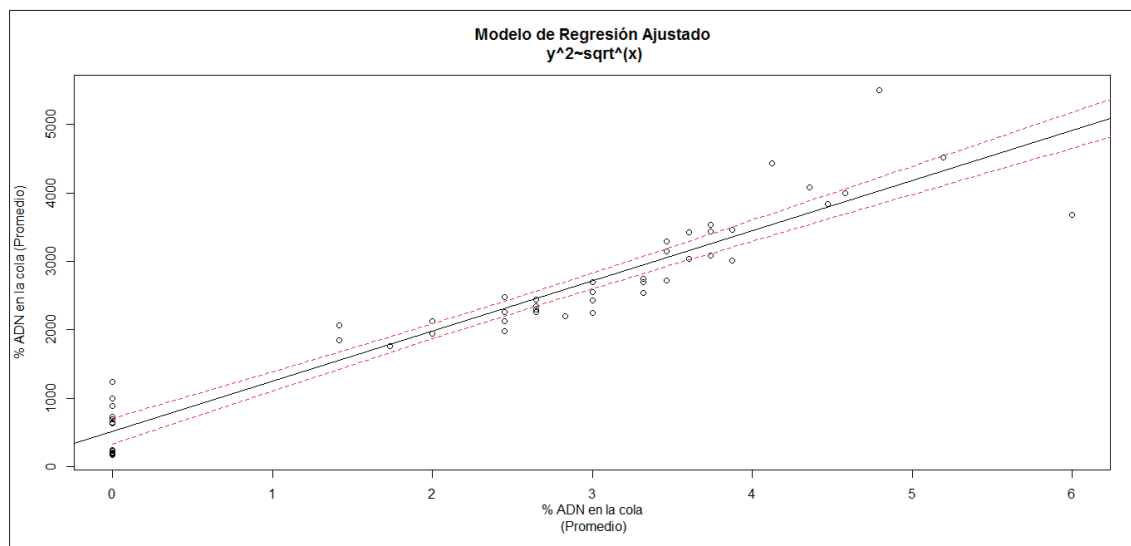
El Test de Wilcoxon para una comparación de dos muestras entre las clases de clasificación se comprobó con el comparativo de los gráficos de Pareto (figura 1). La diferencia fue mayor en el Grup_Exp que el Grup_Ctrl ($W = 1793152$; $p\text{-valor} < 0,05$; $\alpha = 95\%$).

EFFECTO GENOTÓXICO DE LAS MEZCLAS COMPLEJAS DE HIDROCARBUROS
EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO DE GASOLINA



Fuente: datos del estudio.

Figura 1. Gráfico de Pareto Comparativo entre el Grup_Ctrl y Grup_Exp para la Clasificación de Cometas por nivel de daño



Fuente: datos del estudio.

Figura 2. Gráfico del Modelo de Regresión Ajustado

A través de una regresión simple se determinó que el modelo de degradación de ADN es $y = \sqrt{512,687 + 733,899 \sqrt{\text{tiempo de exposición en años}}}$, previo ajuste de la curva de regresión. Para el modelo lineal se encontró que la asíntota del modelo se encuentra alrededor del segundo trienio (3 - 6 años) de exposición, lo que repercute en una correlación media-alta entre variables, así como una baja representatividad del modelo ajustado ($r_p = 0,82$; $r^2 = 68,81\%$; $r_{gl2} = 68,81\%$; $p \geq 0,05$). Al ajustar los valores extremos correspondiente a un modelo más acorde, la correlación entre variables y representatividad del modelo ajustado aumentó a un parámetro significativo ($r_p = 0,95$; $r^2 = 90,53\%$; $r_{gl2} = 90,35\%$; $p < 0,05$).

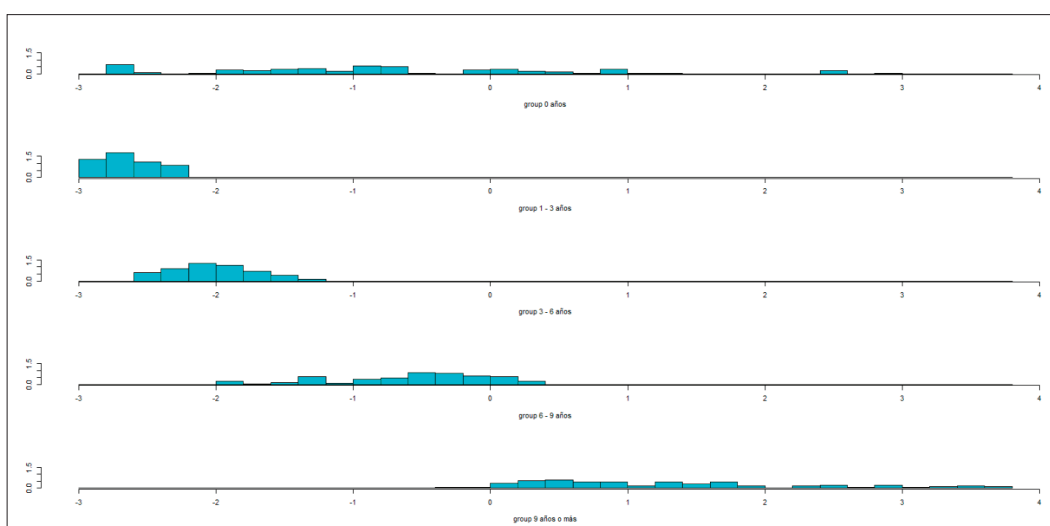
Con la finalidad de comprobar lo encontrado en el Análisis de Regresión Simple se utilizó una técnica multivariada de clasificación, el análisis discriminante descriptivo o simple (ADD). Los datos se organizaron por trienios de exposición y el Grup_Ctrl se incluyó como factor corrector de la discriminación. Los factores de discriminación fueron los porcentajes de clasificación de cometas por nivel de daño (% ADN en la Cola) por individuo.

Tabla 3. Resumen global de Tiempo de Exposición en Trienios por Clasificación de Cometas por nivel de daño

Grupos	Clasificación de Cometas por nivel de daño				
	Clase 0	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Grup_Ctrl	38.5 %	43.5 %	44.0 %	11.4 %	6.1 %
1 ^{er} Trienio	5.3 %	4.0 %	1.6 %	2.8 %	5.0 %
2 ^o Trienio	8.1 %	6.9 %	7.2 %	6.7 %	8.2 %
3 ^{er} Trienio	17.3 %	17.4 %	15.2 %	18.9 %	22.0 %
4 ^o Trienio	9.7 %	8.7 %	10.5 %	11.6 %	15.2 %
5 ^o Trienio	15.4 %	12.8 %	13.4 %	30.9 %	24.1 %
6 ^o Trienio	5.8 %	6.6 %	8.0 %	17.7 %	19.4 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Fuente: datos del estudio.

En los resultados hubo un factor de discriminación entre los individuos pertenecientes al 1^{er}, 2^o y 3^{er} trienio de exposición del Grup_Ctrl, pero no fue posible separar los individuos pertenecientes al 4^o y 5^o trienio. Este resultado valida el modelo de regresión obtenido y la extracción *a priori* de los valores extremos que se encontraron en los individuos con más de diez años de exposición laboral a HAPs.



Fuente: datos del estudio.

Figura 3. Análisis Discriminante de los individuos organizados por Tiempo de Exposición en Trienios por Clasificación de Cometas por nivel de daño

En el Grup_Ctrl y el grupo de individuos con 1^{er} trienio de exposición (1-3 años de exposición laboral) es mayor el factor de separación que el existente entre los del 1^{er} trienio con respecto al 2^o, lo cual indica que no es lineal el nivel de daño (% ADN en la cola) con respecto al tiempo de exposición y señalado también por el resultado del modelo de regresión simple ajustado.

DISCUSION

Los factores intrínsecos (estrés oxidativo enzimáticos, mecanismos de escisión del ADN) y extrínsecos (estilos de vida, radiación solar, dieta, entre otros) generan daño primario. Para los estudios de ecogenotoxicología que utilicen la CA es fundamental la correcta selección del grupo control (24). Por ello es necesario controlar la edad para que no existan diferencias de medias y varianzas entre Grup_Ctrl y Grup_Exp, garantizando la homogeneidad de este factor (25), tal como se evidenció en nuestros resultados.

El estudio realizado por Møller (26) muestra que el daño basal es de $9,5 \pm 5,8$ %, con un rango intercuartílico 5,1 - 14,2 %, pero Pupo et al. (25) demostraron que para las poblaciones ubicadas en el Caribe el promedio es $34,98 \pm 19,6$ % y el rango intercuartílico entre 20,5 - 47,5 %, lo cual indica que los controles de nuestro trabajo se encuentran dentro del rango debido a las coordenadas del centro urbano donde se realizó el estudio (10° 57' 42" de latitud norte y 74° 46' 54" de longitud occidental). El aumento del daño basal de los controles se encuentra principalmente por el nivel de rayos UV que recibe la zona tropical, que presenta en promedio un Índice UV de 10 (Muy Alta) (27), lo que implica una mayor exposición y un mayor riesgo de daño a nivel celular.

La diferencia encontrada en el nivel de daño entre el Grup_Ctrl y Grup_Exp ha sido un factor constante en los estudios *in vivo* e *in vitro*, en los cuales se ha demostrado que sustancias que estructuralmente tienen benzenos y/o compuestos policíclicos saturados causan la fragmentación del ADN (7, 9, 28). Los compuestos policíclicos saturados actúan como agente oxidante, produciéndose una sustancia reactiva de oxígeno (ROS), la cual ocasiona la ruptura del enlace glucosídico en la hebra del ADN, creándose un sitio apurínico/apirimidínico (AP), dejando espacios en la continuidad de la cadena que son inestables al momento de la replicación (29,30), manifestándose finalmente como un daño primario masivo de la cadena de ADN.

La alta variabilidad del Grup_Exp a medida que aumenta el tiempo de exposición es un referente con respecto a la inactivación progresiva de los mecanismos de reparación del ADN, lo cual ha sido documentado para algunas infecciones respiratorias recurrentes (31). Este patrón de comportamiento nos indica que el efecto genotóxico no se produce una alta concentración del agente alquilante, sino por la exposición continua a bajas concentraciones al mismo.

Este mismo concepto aplica para el Análisis Discriminante Descriptivo (ADD), en el que no fue posible separar los grupos correspondientes al 4° y 5° trienio de exposición. Esto plantea que si bien se manejan niveles de exposición al agente genotóxico, no se contempla la variable "tiempo de exposición" como un factor fundamental en el deterioro del material genético (6, 32).

El modelo de regresión indica que el tiempo máximo de exposición se encuentra alrededor de los 6 años de trabajo, ya que hasta

ese momento la curva no ha alcanzado el 80 %, lo cual posibilita la reactivación de los mecanismos de protección celular (33). Este mismo resultado se encontró en los fumadores y obreros expuestos a materia particulada, donde una baja pero prolongada exposición presentaba los mismos resultados que una exposición a altas dosis (13, 34, 35).

Agradecimientos

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a los miembros del Grupo de Investigación en Genética (Universidad Simón Bolívar) y Genética y Bioquímica (Universidad del Atlántico) porque sin su apoyo y dedicación esta investigación no hubiese sido posible. Asimismo, al equipo Administrativo del Programa de Medicina de la Universidad Simón Bolívar, que apoyó moral y emocionalmente, apoyo que es tan fundamental como el económico.

Conflicto de interés: ninguno.

Financiación: Universidad Simón Bolívar.

REFERENCIAS

1. Rodríguez-Morales AJ. Ecoepidemiología y epidemiología satelital: nuevas herramientas en el manejo de problemas en salud pública. *Rev peru med exp salud pública* 2005;22(1):54-63.
2. Newman-Taylor AJ, Yucesov B. Genetics and occupational asthma. *Asthma in the Workplace* 2006; 87-108.
3. Suspiro A, Prista J. Biomarkers of occupational exposure to anticancer agents: a minireview. *Toxicol Lett* 2011;207(1):42-52.
4. Ferrante D, Linetzky B, Konfino J, King A, Virgolini M, Laspiur S. Encuesta nacional de factores de riesgo 2009: Evolución de la epidemia de enfermedades crónicas no transmisibles en Argentina. Estudio de Corte Transversal. *Rev Argent Salud Pública* 2011;2(6):34-41.
5. Bello D, Herrick C a, Smith TJ, Woskie SR, StreicherRP, CullenMR et al. Skin exposure to isocyanates: reasons for concern. *Environ Health Perspect* 2007;115(3):328-35.
6. Peng C, Ouyang Z, Wang M, Chen W, Li X, Crittenden JC. Assessing the combined risks of PAHs and metals in urban soils by urbanization indicators. *Environ Pollut.* 2013;178:426-32.
7. Chen CS, Hseu YC, Liang SH, Kuo J-Y, Chen SC. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butylether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xyleno human lymphocytes using comet assay. *J Hazard Mater* 2008;153(1-2):351-6.
8. Carreras HA, Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Murillo-Tovar MA, Amador-Muñoz O. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. *Environ Pollut* 2013;178:403-10.
9. Rodrigues FP, AngeliJPF, Mantovani MS, Guedes CLB, Jordão BQ. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. *Genet Mol Biol* 2010;33(1):169-75.
10. Quintana MM, Salcedo S, Luna JD, González HJ, Jaramillo VP, Yandar NY. Determination of Genotoxic Biomarker from a Chronically Exposed Population to Coal Mining. 1st Latin-American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology (TOXI-LATIN 2014). Porto Alegre; 2014.
11. Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan MF. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233(2):247-53.
12. Kimber I, PichowskiJS, Betts CJ, Cumberbatch M, Basketter DA, Dearman RJ. Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicol In Vitro* 2001;15(4-5):307-12.
13. Carrieri M, Tranfo G, Pignini D, Paci E, Salamon F, Scapellato ML et al. Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators. *Toxicol Lett* 2010;192(1):17-21.

14. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement M-V. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014;2:457-65.
15. Azqueta A, Slyskova J, Langie S a S, O'Neill Gaivão I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet* 2014;5:288.
16. Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res* 2009;681(1):93-109.
17. Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A et al. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoeworkers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res* 1999;441(1):115-27.
18. Bridges BA, Cole J, Favor J, Glickman BW, Mohrenweiser H, Sankaranarayanan K et al. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Spontaneous mutation and its place in risk assessment for chemical mutagens. Report of an ICPEMC Committee. *Mutat Res* 1994;304(1):3-11.
19. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175(1):184-91.
20. Zúñiga-Venegas LA, Dauder RM, Capdevila A. *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana*. Universitat Autònoma de Barcelona; 2009. p. 223.
21. R CoreTeam. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
22. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26(3):249-61.
23. Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 2006;314:275-86.
24. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003;18(1):45-51.
25. Pupo Balboa JB, Gutiérrez Gutiérrez R, Pandolfi Blanco A, Cásido Rodríguez M, Valdés Ramos L, De Armas Santiesteban A. Daño basal del ADN en un grupo de individuos cubanos sanos mediante ensayo Cometa alcalino. *Acta bioquímica clínica Latinoam* 2014;48(3):367-73.
26. Møller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 2006;612(2):84-104.
27. Instituto de Hidrología Meteorología y Estudios I. Ozono e Índice UV.
28. Fracasso ME, Doria D, Bartolucci GB, Carreri M, Lovreglio P, Ballini A et al. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicol Lett* 2010;192(1):22-8.
29. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):3-12.
30. Azqueta A, Langie SAS, Slyskova J, Collins AR. Measurement of DNA base and nucleotide excision repair activities in mammalian cells and tissues using the comet assay-a methodological overview. *DNA Repair (Amst)* 2013;12(11):1007-10.
31. Patiño PJ, Salgado H, Od DG De, Montoya CJ. Análisis de laboratorio en los pacientes que presentan infección recurrente y pueden sufrir de inmunodeficiencia. *Salud Uninorte (Col)* 2003;17:40-50.
32. Rekhadevi PV, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 2010;54(8):944-54.
33. Archana M, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. Various methods available for detection of apoptotic cells-a review. *Indian J Cancer* 2013;50(3):274-83.
34. Amarillo AC, Carreras H A. The effect of airborne particles and weather conditions on pediatric respiratory infections in Cordoba, Argentina. *Environ Pollut* 2012;170:217-21.

35. Møller P, Danielsen PH, Karottki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H et al. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res* 2014; 762: 133-166.