

Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos

MARÍA ELENA MÁRQUEZ FERNÁNDEZ, JUAN BAUTISTA LÓPEZ ORTIZ,
GUILLERMO CORREA LONDOÑO, ANDRÉS PAREJA LÓPEZ, NATALIA ANDREA GIRALDO SOLANO

RESUMEN

EN EL ÁMBITO MUNDIAL se ha encontrado una fuerte relación entre la exposición a agentes genotóxicos y la incidencia de cáncer y problemas reproductivos, en personal ocupacionalmente expuesto. En el presente trabajo se evaluó, en personal vinculado a los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, el efecto de la exposición a agentes potencialmente genotóxicos, mediante las pruebas de intercambio de cromátides hermanas (ICH) y la electroforesis en gel de células individuales (prueba cometa).

Se logró estandarizar herramientas metodológicas que permitieran cuantificar el daño producido por la exposición a agentes potencialmente genotóxicos e implementarlas en programas de monitorización para propósitos de salud ocupacional. La evaluación se realizó en dos poblaciones, una expuesta y una control, mediante el uso de muestras pareadas; para el apareamiento se eligieron individuos de la misma edad, género y hábitos. La prueba cometa mostró daño agudo en la población expuesta, mientras que la prueba de ICH no reveló daño

.....
MARÍA ELENA MÁRQUEZ FERNÁNDEZ*, Bióloga, MSC, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias; JUAN BAUTISTA LÓPEZ ORTIZ, Biólogo, MSC, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias; GUILLERMO CORREA LONDOÑO, Ingeniero Forestal, MSC, Facultad de Ciencias Agropecuarias; ANDRÉS PAREJA LÓPEZ, Estudiante de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias; NATALIA ANDREA GIRALDO SOLANO, Estudiante de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Biotecnología Animal, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. *e-mail: memarque@unalmed.edu.co
Fecha de recepción: 7 de octubre del 2003
Fecha de aceptación: 10 de octubre del 2003

crónico. De otro lado, se encontró que el índice de ICH en las dos poblaciones evaluadas no varió con los hábitos ni con el género, pero sí con la edad. Lo anterior muestra la utilidad de la prueba cometa para medir las exposiciones agudas y la del ICH como una excelente prueba para cuantificar las exposiciones crónicas; estas pruebas son imprescindibles como parte de la batería utilizada en estudios de monitorización genotóxica.

Mediante este estudio se adecuó la infraestructura y se capacitó al personal para llevar a cabo monitorizaciones sobre genotoxicidad con propósitos de salud ocupacional y con el ánimo de extender este servicio tanto a la comunidad universitaria como a los sectores público y privado.

PALABRAS CLAVE

SALUD OCUPACIONAL

GENOTOXICIDAD

PRUEBAS GENOTÓXICAS

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS (ICH)

PRUEBA COMETA

INTRODUCCIÓN

LAS CONDICIONES AMBIENTALES en que viven y trabajan los seres humanos incluyen diversos factores físicos, químicos y biológicos, productos de la tecnología y del avance científico experimental, así como de las ocupaciones, oficios y profesiones que generan un ambiente particular. Estos factores pueden resultar nocivos para la salud del individuo y en muchos casos afectar la integridad de su genoma (1).

Entre los diversos daños que puede sufrir el material genético, como consecuencia de condiciones ambientales perjudiciales, están las mutaciones

puntuales y cromosómicas, que pueden propiciar la transformación celular. Si tales alteraciones ocurren en proto-oncogenes o genes supresores de tumores, los cuales están involucrados en el crecimiento y diferenciación celulares, pueden propiciar el desarrollo de un cáncer en el órgano comprometido; si ocurren en la línea germinal, pueden originar problemas reproductivos y desórdenes genéticos en las siguientes generaciones (2).

En algunos ambientes de trabajo, como los laboratorios de experimentación para docencia, investigación y extensión, se utilizan diversos tipos de sustancias químicas y de agentes físicos y biológicos, a los cuales están expuestos tanto el personal que labora permanentemente como los usuarios ocasionales de estos espacios. En estos casos no se conocen los riesgos potenciales de exposición a genotóxicos y muchas veces se ignoran también la normatividad para el almacenamiento de sustancias químicas, líquidas o sólidas y las normas de bioseguridad para su manipulación así como, con mayor razón, el tratamiento de los desechos generados por su utilización en los protocolos de experimentación.

En Colombia se han realizado pocas investigaciones sobre genotoxicidad en personal que labore en ambientes de trabajo donde pueda existir exposición a sustancias o agentes reportados como genotóxicos; dichas investigaciones permitirían plantear programas preventivos tendientes a minimizar los riesgos potenciales de la exposición ocupacional a tales sustancias o agentes.

En la actualidad se utilizan diferentes pruebas in vivo e in vitro en sistemas celulares procarióticos y eucarióticos, con un alto grado de sensibilidad, para medir diversos tipos de daños del ADN. Entre ellas están la prueba de Ames, micronúcleos, aberraciones cromosómicas (3,4), aductos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), intercambio de cromátides hermanas (ICH) (5,6) y la prueba cometa en linfocitos de sangre periférica (7-9).

En general, las pruebas de ICH y cometa son de gran utilidad en esta evaluación, por su sensibilidad para detectar daños crónicos y agudos respectivamente, por la rapidez con que se realizan y por su utilidad potencial para evaluar cualquier población celular eucariótica (9,10). La prueba de ICH muestra alta resolución en la evaluación del daño crónico reparado, mientras que la prueba cometa permite el análisis de datos individuales y el uso de muestras celulares extremadamente pequeñas, entre otras ventajas.

En este trabajo se evaluó la exposición ocupacional a genotóxicos en el personal vinculado a los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, mediante el intercambio de cromátides hermanas (ICH) y la prueba cometa. No se pretendió evaluar genotóxicos específicos sino el efecto de trabajar en recintos donde se manejan distintas sustancias químicas cuya mezcla compleja crea un ambiente que puede o no resultar genotóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

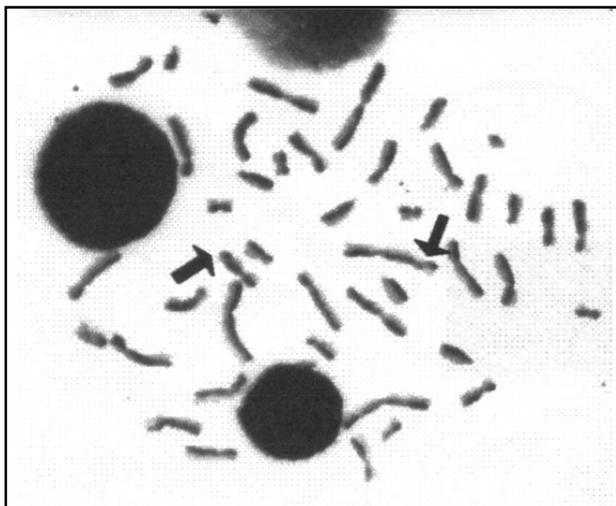
TANTO LA PRUEBA COMETA como el intercambio de cromátides hermanas se hicieron sobre muestras de sangre periférica heparinizada de dos grupos de estudio: el primero consistió en 20 laboratoristas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; el segundo estuvo constituido por 20 individuos control, que no tuvieran exposición potencial a sustancias genotóxicas y que guardaran correspondencia uno a uno con el género, los grupos de edad y los hábitos de los laboratoristas expuestos. Para la elección de los sujetos se aplicaron dos encuestas: la primera a los laboratoristas para identificar a los que manipulaban sustancias químicas potencialmente genotóxicas y definir su nivel de

exposición; la segunda se aplicó a ambos grupos, con el fin de recopilar datos relacionados con las normas de bioseguridad y los hábitos personales que pudieran influir en los resultados de las pruebas para genotoxicidad.

Intercambio de cromátides hermanas (ICH)

DE CADA MUESTRA DE SANGRE se realizó un cultivo para el análisis de ICH, usando 1 ml de sangre en 8 ml de medio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, Missouri) suplementado con 1 ml de suero bovino fetal, 100 ml de antibióticos (penicilina-estreptomina) y 50 ml de extracto crudo de fitohemaglutinina (preparado de frijol seco *Phaseolus vulgaris*), y 100 ml de 5-bromodeoxiuridina (BrdUrd, 2mg/ml), la cual se adicionó en el momento del cultivo. Los cultivos se incubaron durante 56 horas en la oscuridad. Para la preparación cromosómica se adicionaron 100 ml de Colcemid (10 mg/ml), 30 minutos antes de la cosecha. Al finalizar el período de incubación se trataron las células con una solución hipotónica de KCl (0.075 M) a 37 °C por 7 minutos, luego se hicieron la fijación y los lavados con una mezcla de metanol y ácido acético, en proporción de 3:1. La suspensión celular se goteó sobre portaobjetos limpios y se flameó. La tinción diferencial se llevó a cabo con fluorocromo Hoechst 33258 (0.6 mg/ml), durante 10 minutos; después se irradiaron las placas durante 20 minutos en una cámara provista de una lámpara halógena de 150 W 120 V, y luego se tiñeron con solución Giemsa al 5% por 7 minutos. Como resultado de esta tinción se obtuvo la coloración diferencial entre cromátides hermanas en segundo ciclo, observando una cromátide clara y otra oscura que le da al cromosoma un aspecto de arlequín (**Figura N° 1**). Para cada individuo la frecuencia de ICH se determinó analizando 50 metafases.

Figura N° 1
METAFASE DE SEGUNDO CICLO REPLICADA EN
BrdUrd Y TEÑIDA CON TINCIÓN DIFERENCIAL. LAS
FLECHAS SEÑALAN LOS SITIOS DE INTERCAMBIO.

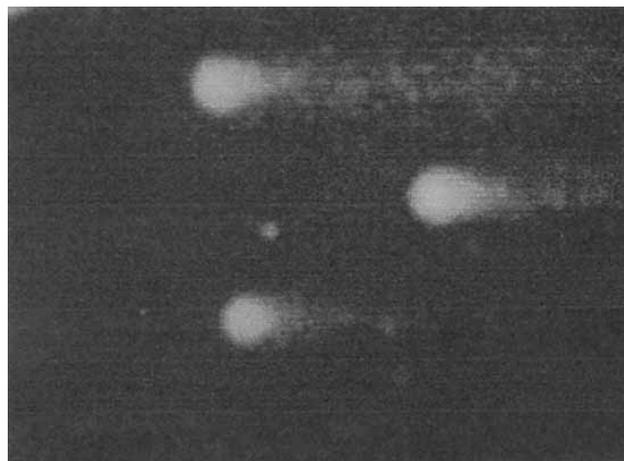


Electroforesis en gel de células individuales (Prueba cometa)

SE AISLARON LINFOCITOS de sangre periférica heparinizada, obtenida tanto de los laboratoristas como de los individuos control. Inicialmente se centrifugó la sangre a 1.500 rpm, por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en solución salina balanceada con fosfato (PBS) en proporción 1:1. Posteriormente se aislaron los linfocitos utilizando el método de separación por densidades con 3 ml de Hystopaque-1077 (Sigma St. Louis, Missouri). La suspensión se centrifugó a 2.000 rpm, por 30 minutos, se realizaron dos lavados con PBS y finalmente se resuspendió el sedimento en 2 ml de PBS. La viabilidad de las células se determinó mediante exclusión de colorante vital azul de tripano. Se utilizaron concentraciones de 2×10^5 células/ml suspendidas en agarosa de bajo punto

de fusión, LMA por su sigla en inglés, (0.5% en PBS libre de Ca^{++} , Mg^{++}) en placas pretratadas con 100 ml de agarosa de punto de fusión normal, NMA por su sigla en inglés, (0.5 % en PBS libre de Ca^{++} , Mg^{++}). Después de 6 minutos a 4 °C, se colocaron las placas en solución de lisis (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCL 10% dimetil sulfóxido (DMSO) 1% de Triton X 100) pH 10, por 60 minutos a 4° C. Luego se incubaron en solución tampón de electroforesis (0.3 M NaOH, 200 mM, EDTA 1mM, pH = 13) por 30 minutos en un cuarto oscuro a 4 °C antes del corrido electroforético, el cual se realizó durante 30 minutos a 25V y 300 mA. Las placas se lavaron con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCL; pH = 7.5), se colorearon con bromuro de etidio y se visualizaron con un aumento de 10X en un microscopio Olympus provisto de sistema de fluorescencia. Se evaluaron 50 núcleos y se determinaron las longitudes de los cometas con un dispositivo micrométrico (**Figura N° 2**).

Figura N° 2
EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN POR MEDIO DE
LA PRUEBA COMETA. LAS LONGITUDES DE LAS
COLAS DE LOS COMETAS FUERON MEDIDAS CON UN
MICRÓMETRO EN MICROSCOPIO OLYMPUS
UTILIZANDO BROMURO DE ETIDIO.



Análisis estadístico

PARA CADA UNA DE LAS PRUEBAS –ICH y prueba cometa–, se realizaron las comparaciones entre la población expuesta y la población control con base en una prueba t para muestras pareadas. Se ajustó además un modelo de regresión lineal simple para estimar el efecto de la edad, el género y los hábitos, sobre el índice de ICH.

RESULTADOS

NO SE ENCONTRÓ DIFERENCIA estadísticamente significativa entre el índice medio de ICH de la población de laboratoristas y el de la población

control ($p = 0.43$). No se encontró correlación significativa entre el género y el hábito de fumar, pero sí una relación lineal estadísticamente significativa entre la edad y el índice de ICH, tanto en la población de laboratoristas como en la de control (**Tabla N° 1, Figura N° 3**). El coeficiente de regresión indica que para el rango de edad en que se realizó el estudio (25-55 años), el índice de ICH aumenta en promedio 0.1 unidades por año.

Usando una prueba de t unilateral, la longitud media de la cola evaluada con la prueba cometa difirió significativamente entre las dos poblaciones ($p = 0.0041$): la de la población expuesta fue 4.59363 unidades superior a la de la población control (**Figura N° 4**).

Tabla N° 1
REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DEL ÍNDICE ICH EN FUNCIÓN DE LA EDAD

Parámetros estimados					
Variable	G.L.	Parámetro estimado	Error estándar	Valor T	Pr > t
Intercepto	1	1.95296	0.80746	2.42	0.0205
Edad	1	0.10836	0.02163	5.01	<.0001

Figura N° 3
RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE ICH Y LA EDAD, PARA AMBOS GRUPOS POBLACIONALES

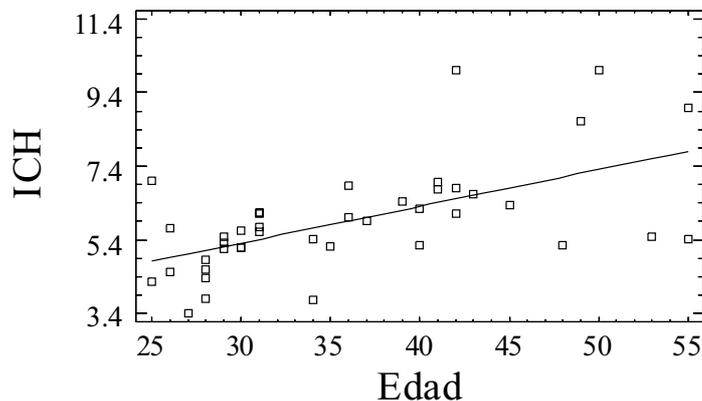
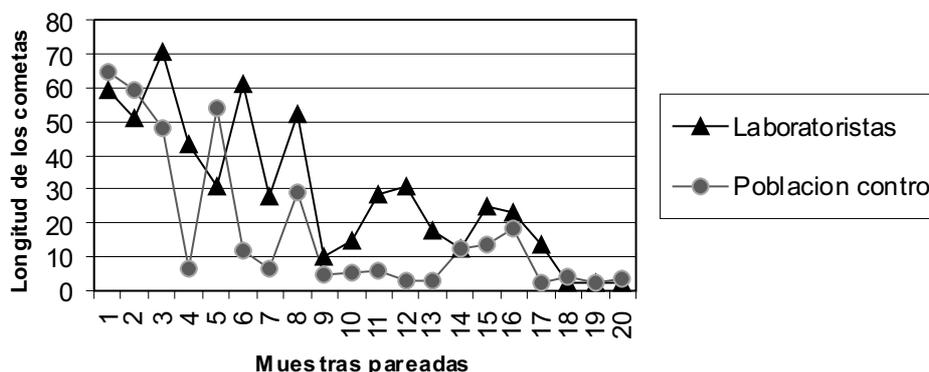


Figura N° 4
LONGITUD DE LOS COMETAS EN LAS MUESTRAS PAREADAS



DISCUSIÓN

EN EL PRESENTE TRABAJO se detectó daño genético agudo mediante la prueba cometa, en la población de laboratoristas expuestos ocupacionalmente a mezclas de sustancias químicas potencialmente genotóxicas, similar al encontrado por otros investigadores que utilizan esta prueba para detectar el daño inducido por factores ambientales y laborales (8,13). De otro lado, la prueba de ICH, que detecta el daño en exposición crónica, no mostró diferencia significativa entre las dos poblaciones estudiadas; sin embargo, se encontró que el índice de ICH varía con la edad, lo que está de acuerdo con lo reportado por otros investigadores (5). Estos resultados sugieren que la prueba cometa sigue siendo de alta sensibilidad para detectar daño en el ADN por exposición ocupacional aguda, condiciones ambientales y hábitos, como lo sugieren algunos autores (14). Además de su alta sensibilidad, es importante destacar su rapidez y bajo costo, que la hacen recomendable en programas de monitorización ocupacional. La exposición ocupacional a agentes genotóxicos es un problema de salud pública, porque se ha encontrado en los ambientes de

trabajo una gran variedad de factores, tales como sustancias, partículas, fibras y agentes físicos que pueden afectar el genoma de las células somáticas o germinales de los trabajadores expuestos.

En este sentido, en Estados Unidos, se ha estimado que cada año aproximadamente 500.000 muertes se deben al cáncer y 20.000 de ellas se atribuyen a exposición ocupacional (11). Si las alteraciones genéticas ocurren en la línea germinal pueden producir problemas reproductivos y desórdenes genéticos en las siguientes generaciones. Se ha estimado que el 50% de las muertes fetales, el 30% de los retardos mentales, el 20% de los defectos congénitos y el 2% de las infertilidades masculinas están asociados con aberraciones cromosómicas (12). En Colombia no se tienen datos de la epidemiología del cáncer relacionado con factores ocupacionales ni de las enfermedades reproductivas ocasionadas por factores ambientales; tampoco se han implementado pruebas diagnósticas que evalúen de manera rutinaria la exposición ocupacional a sustancias genotóxicas, a pesar de ser éste un problema que se ha venido estudiando

desde principios de los años sesenta del siglo XX en varios países.

La realización de este trabajo motiva la implementación de nuevas estrategias epidemiológicas, que permitan detectar e identificar, de manera sencilla y económica, la presencia de agentes potencialmente genotóxicos ocupacionales así como establecer baterías de pruebas que faciliten la detección y la prevención del cáncer y las enfermedades reproductivas ocasionados por exposición ocupacional a agentes potencialmente genotóxicos.

AGRADECIMIENTOS

LOS AUTORES DE ESTE ARTÍCULO agradecen a los siguientes colaboradores: UNISALUD, por la toma de muestras; al Colegio Mayor de Antioquia por el apoyo técnico con el microscopio de fluorescencia; a la bióloga Nelly Velásquez por entrenar el personal en todo lo relacionado con la prueba cometa. A Alcira Bonilla por su apoyo desde la Oficina de Salud Ocupacional. A las Facultades de Ciencias y Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional. A todos los individuos que facilitaron las muestras de sangre para el estudio. A la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín –DIME– por la financiación de este proyecto.

SUMMARY

DETECTION OF ACUTE AND CHRONIC GENOTOXIC DAMAGE IN AN OCCUPATIONALLY-EXPOSED POPULATION

WORLDWIDE STUDIES IN PEOPLE occupationally exposed to genotoxic agents have shown a strong correlation of the exposition with cancer incidence

and reproductive dysfunctions. This research evaluated, in laboratory personnel at the Universidad Nacional, Medellín, Colombia, the effect of exposition to potentially genotoxic agents, by means of sister chromatids interchange tests (SCI) and electrophoresis in single cells gel (comet assay). Standardization of methodological tools to quantify the damage produced by exposition to potentially genotoxic agents was achieved, in order to implement them in occupational health monitoring programs. Evaluation was carried out in two populations, exposed and control, using paired samples. Age, sex and habits were used as criterions for pairing. Comet assay showed punctual damage in the exposed population, while SCI test did not reveal chronic damage. On the other hand, neither habits nor sex showed relation with SCI index, but age did. The usefulness of the comet assay to measure the effect of punctual expositions, and that of SCI as an excellent test to quantify the effect of chronic expositions, makes them indispensable as part of the battery used in genotoxic monitoring studies.

As part of the benefits of this research, infrastructure was adapted and some personnel was qualified to carry out occupational health genotoxic monitoring, with the aim of extending this service to the University community and to the private and public sectors.

KEY WORDS

OCCUPATIONAL HEALTH
GENOTOXICITY
GENOTOXIC TESTS
SISTER CROMATIDAS INTERCHANGE
COMET ASSAY

BIBLIOGRAFÍA

1. KESHAVA N, ONG TM. Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res* 1999; 437: 175-194.
2. WEISBURGER JH. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. *Mutat Res* 1999; 437: 105-112.
3. SORSA M, PYY L, SALOMAA S, NYLUND L, YAGER JW. Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutat Res* 1988; 204: 465-479.
4. FATIMA SK, PRABHAVATHI A, REDDY PP. Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust. *Mutat Res* 2001; 490: 179-186.
5. HERRERA NP, QUINTAL JMC, ESCALANTE DP. Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Rev Biomed* 1999; 10: 71-76.
6. SHAHAN J, KAUFMAN Z, GURVICH R, LEVI Z. Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 2001; 491: 71-80.
7. ROJAS E, VALVERDE M, LÓPEZ MC, NAUFAL I, SANCHEZ I, BIZARRO P, et al. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 2000; 468: 11-17.
8. VRHOVAC VG, ZELJEZIC D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat Res* 2000; 469: 279-285.
9. BETTI C, DAVINI T, GIANNESI L, LOPRINEO N, BARALE R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res* 1995; 343: 201-207.
10. CARERE A, ANDREOLI C, GALATI R, LEOPARDI P, MARCON F, ROSATI MV et al. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat Res* 2002; 518: 215-224.
11. NORA, *Cancer Research Methods*, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, 1996: p38.
12. HOOK EB. The value and limitations of clinical observations in assessing chemical-induced genetic damage in humans. In: BRIDGES BA, BUTTERWORTH BE, WEINSTEIN IB, eds. *Banbury Report 13: indicators of genotoxic exposure*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982: 19-32.
13. UNDGER Ü, BASARAN N, KARS A GÜÇ. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutat Res* 1999; 439: 277-285.
14. KASSIE F, PAZEFALL W, KNASMULER S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human monitoring studies. *Mutat Res* 2000; 463: 13-31.

