

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN PERSONAL DE
LABORATORIO DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN EXPUESTO A
MUTÁGENOS QUÍMICOS EN LA CIUDAD DE QUITO.**

**AUTOR/A (S):
ADRIANA MELISA BONILLA JEREZ
DIANA ABIGAIL GONZÁLEZ CANO**

**DIRECTOR/A:
GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIERREZ**

Quito, mayo del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotros, autorizamos a las Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, mayo 2015

Adriana Melisa Bonilla Jerez

171900321-0

Diana Abigail González Cano

172384219-9

DEDICATORIA

Este trabajo dedico a mis padres por estar a mi lado y apoyarme en cada momento, a mi hermana que aún muy joven me ha sabido aconsejar y darme ánimos para culminar esta etapa de mi vida, demostrando ser un ejemplo para ella, a mis amigos y amiga, especialmente a Abi gatu por ser una gran amiga y por su infinita paciencia y comprensión en mi nueva etapa como madre, a David mi gran apoyo y confidente por alentarme y no dejar que me rinda en este duro; pero no difícil trayecto y sobre todo por demostrarme tanta paciencia y bondad que para mí significa mucho y principalmente a mi hija Amelita, quien me da y me dará más fuerzas para superarme y salir adelante y porque hace que cada día sea único e importante junto a ella.

Adriana Bonilla

El presente trabajo dedico a mis padres por confiar en mí, enseñarme valores y principios bajo la bendición de nuestro padre todopoderoso, y que me han convertido en la mujer que hoy en día soy, a mis hermanos por haber estado presentes en cada meta cumplida y especialmente a mi hermana Cristina González, por creer siempre que su pequeña hermana es la “científica” de mi maravilloso hogar, a mi confidente, el del Oso por ser madre y padre para mí y “salvarme” tantas veces y a mi Ratón por sus consejos que no me dejaron desfallecer, así como también a aquella persona que gracias a su cariño siempre dibujé una sonrisa cada mañana. No puedo dejar de lado el gran apoyo de amigas incondicionales y verdaderas, así como de mi compañera de tesis Adri por luchar y alcanzar un objetivo en común graduarnos.

Abigail González

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a todos quienes contribuyeron en la realización de este trabajo de grado, permitiendo concluirlo con gran satisfacción y emprendimiento.

Agradecemos especialmente a nuestra increíble tutora Germania Karolys por confiar en nosotras para sacar adelante esta investigación, a la Doctora Mónica Ruiz por el tiempo brindado en los primeros pasos dados, a María José Muñoz por compartir sus conocimientos sobre la técnica aprendida para este estudio y a Daniel Pozo por su apoyo en la toma de muestras.

Al grupo de investigadores del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la prestigiosa Universidad de las Américas (UDLA) y a su director Cesar Paz y Miño, que junto a Paola Leone y María Eugenia Sánchez nos brindaron sus conocimientos y permitieron la utilización de las instalaciones del laboratorio donde pudimos culminar la investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Justificación.....	2
Objetivos	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis.....	4
CAPÍTULO 1	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Generalidades	5
1.2 Mutágenos	6
1.2.1 Mutágenos biológicos	7
1.2.2 Mutágenos físicos	7
1.2.3 Mutágenos químicos	8
1.3 Mecanismos de reparación del ADN.....	11
1.3.1 Reparación por supresión de bases (BER)	12
1.3.2 Reparación por supresión de nucleótidos (NER)	13
1.3.3 Reparación de pares erróneos (MMR)	13
1.3.4 Reparación de rompimientos de la doble hebra (DBR)	13
1.4 Fragmentación del ADN	14
1.4.1 Efectos de la fragmentación por mutágenos	14
1.5 Personal en riesgo.....	15
1.5.1 Laboratorios de docencia e investigación	16
1.5.2 Tiempo de exposición	19
1.5.3 Equipo de protección personal	21

1.6	Evaluación de los daños producidos al ADN	22
1.6.1	Ensayos <i>in vivo</i>	22
1.6.2	Fundamento del Ensayo Cometa.....	23
CAPÍTULO 2		26
METODOLOGÍA		26
2.1	Muestras biológicas	28
2.1.1	Ensayo Cometa.....	28
CAPÍTULO 3		30
RESULTADOS.....		30
3.1	Factores de riesgo	30
3.1.1	Compuestos químicos a los que se encuentran expuestos	30
3.1.2	Tiempo de exposición	32
3.1.3	Equipo de protección personal (EPP)	32
3.1.4	Factores que predisponen la fragmentación del ADN	33
3.2	Fragmentación en el ADN detectado por el ensayo cometa y su relación con factores de riesgo.....	34
CAPÍTULO 4		39
DISCUSIÓN		39
CONCLUSIONES		44
RECOMENDACIONES		45
LISTA DE REFERENCIAS		46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Análogo de base.....	9
Figura 2.Modo de acción de un agente alquilante.....	10
Figura 3.Agentes intercalantes	11
Figura 4. Clasificación de cometas por categoría y longitud	27
Figura 5. Compuestos químicos a los que los individuos están expuestos.	31
Figura 6 Equipo de protección personal utilizado por los individuos expuestos a mutágenos químicos.....	32
Figura 7 Factores que predisponen la fragmentación del ADN.....	33
Figura 8 Nivel de fragmentación del ADN.....	35
Figura 9 Cometas de los individuos expuestos con nivel de daño alto y total.....	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado para individuos expuestos a mutágenos químicos e individuos control	54
Anexo 2. Ficha Informativa para individuos expuestos a mutágenos químicos e individuos control	56
Anexo 3. Lista de compuestos químicos.....	58
Anexo 4. Procedimiento estandarizado de operaciones - Ensayo Cometa	61
Anexo 5. Factores de riesgo de los individuos expuestos a mutágenos químicos	64
Anexo 6. Factores que predisponen la fragmentación del ADN de los individuos expuestos a mutágenos químicos.	65
Anexo 7. Número de nucleoides según la categoría del nivel de daño en el ADN	66
Anexo 8. Correlación entre el grupo expuesto a mutágenos químicos y grupo control ..	67
Anexo 9. Prueba T. Correlación entre la variable género y el nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	68
Anexo 10. Anova de un factor. Correlación entre la variable edad y el nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	69
Anexo 11. Pruebas no paramétricas. Correlación entre horas a la semana y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	70
Anexo 12. Pruebas no paramétricas. Prueba de Kruskal-Wallis. Correlación entre la variable años y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	70
Anexo 13. Pruebas no paramétricas. Prueba de Kruskal Wallis. Correlación entre mutágeno químico y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	71
Anexo 14. Prueba T. Correlación entre equipo de protección personal y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	72
Anexo 15. Prueba T. Correlación entre consumo de tabaco y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	73
Anexo 16. Prueba T. Correlación entre la variable rayos X y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.	74

RESUMEN

En el Ecuador, el personal que trabaja en laboratorios de docencia e investigación se encuentra expuesto a una gran cantidad de sustancias genotóxicas, las cuales podrían causar trastornos cromosómicos y genéticos. Sin embargo, aún no se conocen los daños que pueden estar ocasionando en el ADN debido al constante contacto a estos compuestos químicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fragmentación del ADN en individuos voluntarios que trabajan en laboratorios de docencia e investigación de la ciudad de Quito que se encuentran expuestos a compuestos químicos y la relación con factores de riesgo tales como: compuesto químico, tiempo de exposición y equipo de protección personal. Para el estudio se tomaron muestras de sangre periférica de 30 individuos expuestos ocupacionalmente y 10 individuos control, se realizó la técnica de Ensayo Cometa y mediante registro visual se analizaron 200 nucleoides por individuo, determinando el nivel de fragmentación y clasificándola en nula, baja, media, alta y total. Los resultados indican que la exposición a agentes mutagénicos químicos está relacionada con la fragmentación del ADN, exhibiendo una diferencia significativa en los niveles nulo ($p=0,000$), bajo ($p=0,002$) y medio ($p=0,012$), entre el grupo expuesto y el control. A pesar de no existir diferencias significativas con respecto al tipo de compuesto químico, los individuos que presentan niveles de fragmentación altos, se encontraron expuestos a solventes orgánicos y tienen un tiempo exposición mayor a 6 años.

ABSTRACT

In Ecuador, the staff working in teaching and research laboratories are exposed to a lot of genotoxic substances, which may cause chromosomal and genetic disorders. However, even those that may be causing damage to DNA due to constant contact with these chemicals are unknown. The aim of this study was to evaluate DNA fragmentation volunteer individuals working in labs for teaching and research in Quito that are exposed to chemicals and the relationship with risk factors such as chemical compound, exposure time and personal protective equipment. To study peripheral blood samples of 30 individuals occupationally exposed and 10 control subjects were taken, the comet assay technique was performed and by visual record 200 Nucleoids analyzed by individual, determining the level of fragmentation and classifying at zero, low, medium tall and full. The results indicate that exposure to mutagenic chemicals is related to DNA fragmentation, exhibiting a significant difference in the zero and secondary levels ($p = 0.000$), low ($p = 0.002$) ($p = 0.012$), between the exposed group and control. Although there are no significant differences regarding the type of chemical compound, individuals who have high levels of fragmentation were found exposed to organic solvents and have more than 6 years' time exposure.

INTRODUCCIÓN

La molécula de ADN controla todas las actividades y funciones celulares, y es donde se almacena toda la información genética, por ello la integridad de ésta molécula constituye un aspecto importante para la salud y el buen funcionamiento del organismo. A pesar de esto el material genético puede ser dañado o fragmentado por numerosos agentes genotóxicos o procesos que pueden producir alteraciones en el ADN; así por ejemplo existen mutágenos químicos que son capaces de dañar las células provocando una carcinogénesis. (Camacho, Morán, Betancourt, Luna, & Benítez, 2008, págs. 2 - 3).

El daño celular producido por estos agentes al encontrarse en elevadas cantidades, afecta a diferentes macromoléculas, tal es el caso de lípidos, proteínas y ADN, conociéndose a este daño como estrés oxidativo que puede dar lugar a alteraciones genéticas sean mutaciones o procesos carcinogénicos. (Martín & Domingo, 2011, pág. 405).

Para detectar el daño en el ADN y tratar aspectos relacionados con su protección y reparación se han desarrollado herramientas sensibles, capaces de medir roturas de cadena simple y doble en el ADN, a partir de material biológico como por ejemplo, en linfocitos humanos periféricos, que representan una población celular, donde el ADN está en una etapa pre-sintética. (Zúñiga, 2009, pág. 12)

Una de las técnicas más usadas que detecta el daño en el ADN es la electroforesis de células individuales, basada en la migración del ADN en gel de agarosa bajo condiciones alcalinas, que al ser observada la célula en el microscopio, por fluorescencia o tinción, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza, región nuclear y cola, formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo; ésta técnica es más conocida como ensayo cometa. (Ostling & Johanson, 1984, págs. 4 - 6). Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, el ensayo cometa se distingue por: sensibilidad para detectar bajos niveles de daño en el ADN, rápida realización, análisis de los datos a nivel de células individuales, pequeño tamaño de muestra, flexibilidad y bajo costo siendo aplicable a cualquier población de células eucariotas. (Camacho, Morán, Betancourt, Luna, & Benítez, 2008, pág. 2).

Justificación

La existencia de productos tóxicos y su uso nos abre la posibilidad de entrar en contacto con ellos fácilmente, pues se encuentran en sectores que no necesariamente son de categoría industrial, se los puede hallar desde pequeños laboratorios hasta grandes empresas químicas; su manipulación, presenta diferentes tipos de peligrosidad según su composición. Uno de los problemas actuales más importantes es la exposición ocupacional a productos tóxicos, por lo que se han realizado diversos estudios con la finalidad de evaluar el riesgo que implican para trabajadores agrícolas (Martínez & G.S., 2007, pág. 2), “así como la relación entre la exposición a derivados de hidrocarburos con alteraciones cromosómicas” (Vázquez & R-F, 2008, pág. 5), sin embargo los laboratorios de enseñanza e investigación también están expuestos a estos productos, el conocimiento del daño que pueden ocasionar en la salud humana es lo que conlleva a realizar estudios de seguridad laboral en ésta área.

Independientemente de la sustancia tóxica, su procedencia y del efecto concreto que produzca tras la exposición al mismo, existen una serie de factores de riesgo que dependen del individuo y pueden condicionar la respuesta a esa exposición. (Fuentes, 2011, págs. 5 - 6)

Los productos genotóxicos, alteran la estructura cromosómica y causan fragmentación en el ADN del personal que manipula dichos productos (Sociedad Americana de Química, 2002, págs. 11 - 20).

En un concepto más claro, un agente genotóxico es aquel que a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados. Bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan directa o indirectamente, con el ADN provocando mutaciones del material proteico involucrado en la segregación cromosómica. (Ramirez & Browner, 2004, pág. 587)

Según un informe realizado en la ciudad de Madrid, España, “en el sector de la enseñanza se da mucho el uso de sustancias químicas, de las cuales el 76,9 % son cancerígenos”. (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, pág. 5)

En el Ecuador, los docentes e investigadores también se encuentran expuestos a una gran cantidad de sustancias genotóxicas, sin embargo, el Código de Trabajo, ley que respalda al empleado público en el Título IV DE LOS RIESGOS DEL TRABAJO, Capítulo I- Determinación de los riesgos y de la responsabilidad del empleador, señala: Art. 347.- “los riesgos del trabajo son las eventualidades dañosas a las que está sujeto el trabajador, con ocasión o por consecuencia de su actividad”; Art. 349 (Corporación Ekosocial, 2012), habla sobre: “las enfermedades profesionales, pero en ningún párrafo se menciona enfermedades causadas por una alteración del genoma bien llamadas, trastornos genéticos, que podrían ser evidenciados a un largo plazo”.

Los laboratorios académicos y de investigación no poseen un documento que respalde la integridad genética de sus trabajadores y el riesgo al que están expuestos, de la misma manera los trabajadores deben ser conscientes del uso y manipulación de mutágenos químicos con un adecuado equipo de protección personal siguiendo protocolos de seguridad propios de cada laboratorio.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la fragmentación del ADN en personal de laboratorios de docencia e investigación expuesto a mutágenos químicos en la ciudad de Quito.

Objetivos específicos

Identificar los factores de riesgo: compuestos químicos, tiempo de exposición y tipo de protección, que pueden estar asociados con la fragmentación del ADN en el personal de laboratorio de docencia e investigación.

Evaluar el daño en el ADN presente en la muestra de sangre periférica mediante la técnica Ensayo Cometa por registro visual y software cellSens Dimension.

Establecer la relación entre los factores de riesgo en la población expuesta a mutágenos químicos y el daño encontrado en las moléculas del ADN.

Hipótesis

La exposición a mutágenos químicos está relacionada con la fragmentación de la molécula de ADN.

La exposición a mutágenos químicos no está relacionada con la fragmentación de la molécula de ADN.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades

En el mundo se estima que existen más de 70.000 sustancias químicas apareciendo alrededor de 1.000 sustancias nuevas anualmente. La exposición a estos compuestos, ya sea durante su formulación, producción o utilización puede tener en algunos casos efectos adversos en la salud de los trabajadores. Estos efectos no tienen por qué estar relacionados con lesiones inmediatas, sino que pueden tardarse incluso años en manifestarse. (Solans & Hernández, 1999, pág. 1)

Algunas de estas sustancias pueden ser genéticamente activas, siendo capaces de interrelacionar con el material genético y de transformar de manera progresiva las células normales a malignas. (Solans & Hernández, 1999, pág. 1). Estos contaminantes son capaces de producir una respuesta adversa en un sistema biológico y pueden manifestarse en forma de accidentes metabólicos o radiación de diversas fuentes. (Four, Larebeke, & Janssen, 2004, págs. 155 - 167), además pueden afectar tanto directa como indirectamente al ADN, provocando mutaciones y daños en el material genético. Es importante distinguir entre los daños en el ADN y las mutaciones; los daños son anomalías químicas en la estructura del ADN, como roturas de cadena sencilla y cadena doble, residuos de 8-hidroxideoxiguanosina, y aductos de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Determinadas proteínas pueden reconocer estas alteraciones en el ADN, de manera que los pueden reparar si hay disponible información redundante para ser copiada, a partir de la secuencia intacta de la cadena de ADN complementaria que no ha sufrido esta alteración. Si una célula no repara daños en su ADN, puede quedar parada la expresión de un gen. (CancerQuest, 2008)

En contraste a los daños en el ADN, una mutación es un cambio en la secuencia de bases del ADN, es decir que no se produce ningún cambio que pueda ser reconocido por las proteínas encargadas de la corrección de estas alteraciones, ya que su composición química y estructural es “normal”. Las mutaciones provenientes de los errores de síntesis

no pueden ser reconocidas por las enzimas una vez que el cambio de bases está presente en ambas cadenas del ADN, de manera que las mutaciones resultan indetectables en la corrección y no son reparadas. Las mutaciones son replicadas durante la división celular

A nivel celular, las mutaciones pueden provocar cambios en el metabolismo y la proliferación de estas células. En el conjunto de células de un organismo, el número de células mutantes aumentará o disminuirá según los efectos de la mutación en la capacidad de la célula para sobrevivir y reproducirse. Aunque son claramente diferentes los unos de los otros, los daños en el ADN y las mutaciones están relacionados, pues los daños en el ADN provocan a menudo errores de síntesis del ADN durante la replicación o la reparación, y estos errores son una causa importante de mutaciones. Teniendo en cuenta las propiedades de los daños en el ADN y las mutaciones, se puede ver que los daños en el ADN son un problema especial en células que no se dividen o que lo hacen lentamente, pues los daños no reparados tienden a acumularse con el tiempo. (Zuluaga, Valencia , & Ortiz, 2009, págs. 33 - 41)

1.2 Mutágenos

Los agentes mutágenos son aquellas sustancias que pueden producir alteraciones en el material genético de las células. Estas mutaciones pueden afectar a la transcripción y replicación del ADN, la acumulación de estas mutaciones pueden llevar al cáncer. Diferentes mutágenos actúan sobre el ADN de manera diferente, alterando el control de la actividad celular, lo que conduce a un funcionamiento inadecuado de la célula, ésta alteración puede adoptar tres formas: cambios en la composición química del ADN, rupturas cromosómicas y adición o supresión de cromosomas. . (Zuluaga, Valencia , & Ortiz, 2009, págs. 36 - 38)

“Los agentes mutagénicos pueden clasificarse en: biológicos que incluyen algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus, físicos como radiaciones ultra violeta e ionizantes y químicos, como el gas mostaza y el 5-bromouracilo” (Zuluaga, Valencia , & Ortiz, 2009, pág. 36).

Se ha observado que la mayoría de los tumores ocasionados por mutágenos están asociados entre un 90-95% de los casos a agentes químicos, entre un 1-5% a agentes físicos (radiaciones) y entre un 1-2% a agentes de tipo biológico o virus. (Abrevaya, 2008)

1.2.1 Mutágenos biológicos

Las posibles fuentes de mutágenos biológicos pueden ser todos los preparados de naturaleza biológica utilizados en medicina profiláctica o terapéutica tales como vacunas, antitoxinas, sangre, suero y antígenos. Los mutágenos biológicos potenciales pueden ser microorganismos, especialmente virus y algunos agentes químicos. En el caso de los virus se ha demostrado que pueden producir anomalías cromosómicas, desde la simple rotura a la pulverización de los cromosomas, por ellos la vacunación con virus puede implicar un gran riesgo. La contaminación viral como consecuencia de las transfusiones, como es el caso de la hepatitis produce roturas cromosómicas tanto en las células de la sangre como de la médula ósea. Las moléculas de ADN recombinante tienen un riesgo debido a que muchos tipos de ADN de células animales contienen secuencias comunes a virus tumorales, el añadir ADN de origen animal a estos nuevos sistemas de replicación o clonado del ADN podrían significar la proliferación incontrolada de una información genética cancerígena. (Diaz & Vega, 2012, pág. 6)

1.2.2 Mutágenos físicos

La radiación ultra violeta, componente de la luz solar, provoca la reacción entre dos residuos de timina adyacentes en la misma hebra, formando a partir de sus dobles enlaces anulares un sistema tricíclico con un anillo de ciclo butano, que se conoce como dímero de timina. Esta asociación covalente de dos timinas impide que pueda emparejarse con sus adeninas complementarias y origina una estructura tridimensional localmente incompatible con el giro de la doble hélice, que fuerza una flexión en la molécula del ADN. Además, se paraliza la replicación, pues la ADN polimerasa no puede reconocer los dímeros y se detiene. La irradiación UV también origina otra reacción entre timinas adyacentes, con formación de dímeros diferentes llamados foto productos, en los que el enlace aparece entre el C-6 de una timina y C-4 del adyacente.

Las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos gamma) pueden provocar apertura de los anillos, fragmentación de las bases, así como rotura del esqueleto covalente del ADN. También generan (por fotólisis del agua) radicales hidroxilo, que producen 8-hidroxiguanina, entre otros. Debido a su mayor poder de penetración, estas radiaciones afectan a todo tipo de tejidos, a diferencia de la luz UV, que provoca lesiones solamente en la piel (Herraéz, 2012, págs. 383 - 404).

1.2.3 Mutágenos químicos

Aumentan la tasa natural de mutaciones, actuando de manera directa, como alquilantes o a su vez intercalantes. La acción directa de diversas sustancias químicas del ambiente (naturales o no) modifican químicamente las bases, la lista de estos agentes mutágenos es muy amplia, y los mecanismos y efectos que producen son muy diversos, algunos descritos hace muchos años, responsables de cánceres en obreros en contacto con el humo y hollín. Algunos actúan como mutágenos directos y otros requieren activarse a carcinógenos activos mediante la acción de ciertas enzimas. (Watson, y otros, 2008, págs. 253 - 260).

1.2.3.1 Mutágenos análogos de bases

Existen compuestos que sustituyen las bases normales y producen errores en la replicación, siendo de estructura similar a las de las bases estándares, pero actuando de manera que se tornan perjudiciales para la célula. Los análogos de bases son tan semejantes que la célula los incorpora en el ADN durante la replicación, opuestamente, a causa de ciertas diferencias estructurales entre análogos y bases normales, éstos se aparean de manera imprecisa, lo que conduce a errores frecuentes. Uno de los mutágenos más comunes es el 5-bromuro de uracilo (figura 1), que se incorpora en lugar de la timina durante la replicación. (Diaz & Vega, 2012, pág. 8)

Análogo de base

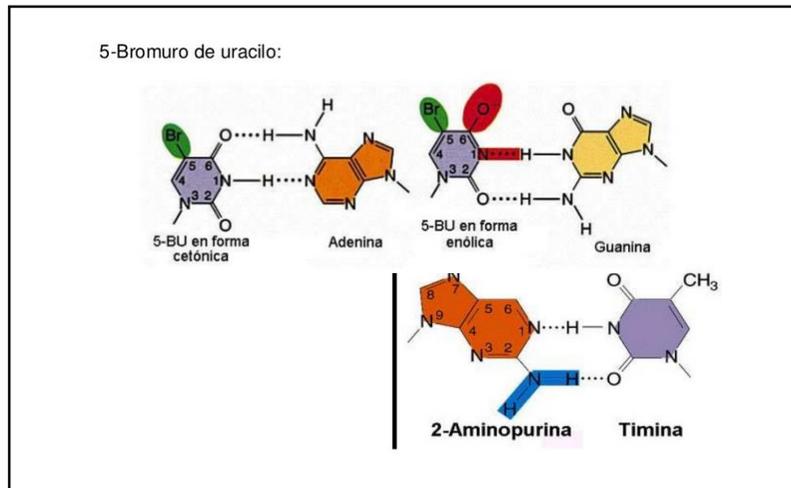


Figura 1. El 5-Bromuro de uracilo es un mutágeno que se incorpora en lugar de la timina durante la replicación.

Fuente: Díaz y Vega, 2012

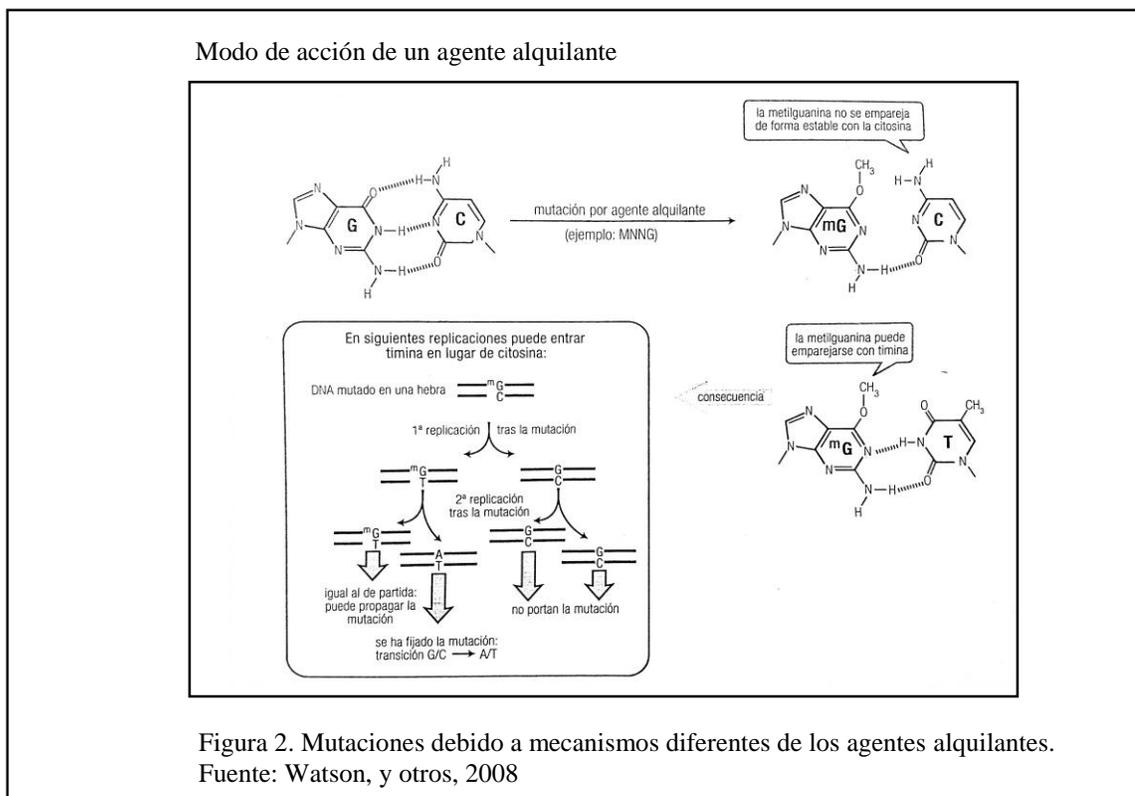
1.2.3.2 Agentes químicos alquilantes

Se transfieren grupos metilo o etilo a sitios reactivos de la base y a fosfatos en las columnas de nucleótidos del ADN, por ejemplo las nitrosaminas, N-metil-N¹-nitro-N-nitrosoguanidina (mutágeno poderoso) y mostazas nitrogenadas. Estos mutágenos químicos inducen aberraciones de tipo cromatídico en todos los estadios celulares, aunque las aberraciones sólo serán visualizadas después de que la célula atraviese un período S (replicación del ADN), se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Los agentes alquilantes funcionan por medio de tres mecanismos diferentes, los cuales alcanzan el mismo resultado, la interrupción de la función del ADN y la muerte celular. (Herraéz, 2012, pág. 385)

En el primer mecanismo un agente alquilante, adhiere grupos alquinos a las bases del ADN. Esta alteración resulta en que el ADN sea fragmentado por las enzimas de reparo cuando éstas tratan de reemplazar las bases alquiladas. Un segundo mecanismo por el cual los agentes alquilantes causan daño al ADN es la formación de puentes cruzados, uniones entre átomos en el ADN (figura 2). En este proceso, dos bases son unidas por medio de un agente alquilante que tiene dos sitios de unión con el ADN; se pueden unir dentro de

una misma molécula de ADN o como puentes cruzados que conectan dos moléculas distintas de ADN. Este enlace previene el ADN de ser separado para la síntesis o la transcripción.

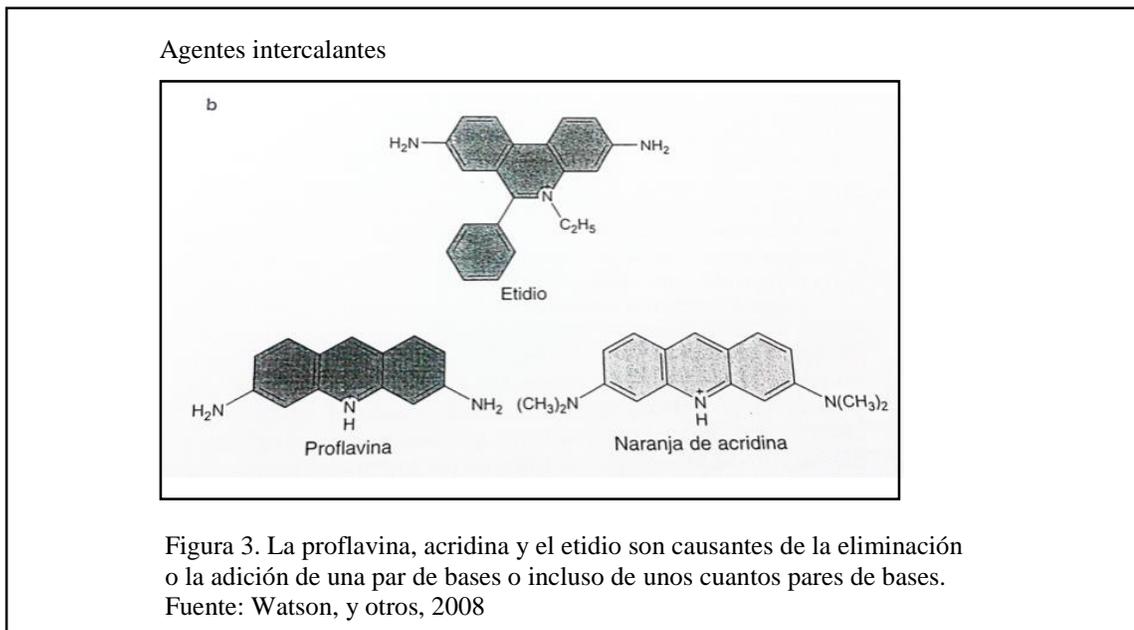
Un tercer mecanismo de acción es la inducción de nucleótidos dispares llevando a mutaciones. En una doble hélice normal de ADN, A siempre se empareja con la T y G con C. Las bases alquiladas G pueden ser emparejadas erróneamente con T. Si esta alteración sucede y no es corregida, esto puede resultar en una mutación permanente. (Diaz & Vega, 2012, pág. 10)



1.2.3.3 Agentes intercalantes

Moléculas planas que se insertan entre las bases púricas o pirimídicas del ADN, como agentes intercalantes que distorsionan su estructura helicoidal; los más conocidos son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (benzopireno y cloruro de vinilo) etidio, proflavina, la acridina y aminas (figura 3) causantes de la eliminación o la adición de un par de bases o incluso de unos cuantos pares de bases.

Durante la replicación, ésta conformación anormal puede conducir a micro inserciones o micro deleciones en el ADN, originando mutaciones por corrimiento de lectura. Para el caso de inserciones, es posible que por deslizamiento entre bases de la cadena plantilla, éstos mutágenos hacen que la ADN polimerasa inserte un nucleótido adicional frente a la molécula intercalada, duplicando la distancia típica entre dos pares de bases. En cambio en las deleciones, la distorsión de la plantilla causada por la presencia de una molécula intercalada haría que la polimerasa se saltara un nucleótido. (Watson, y otros, 2008, pág. 264)



1.2.3.4 Agentes entrecruzantes

“Reaccionan con el ADN y se cruzan entre bases de la misma hebra o de ambas hebras”.
(Watson, y otros, 2008, pág. 265)

1.3 Mecanismos de reparación del ADN

Las células no pueden funcionar si los daños en el ADN corrompen la integridad y accesibilidad de información esencial en el genoma (pero las células permanecen aparentemente funcionales cuando faltan o están dañados genes "no esenciales"). Según el tipo de daños que ha sufrido la estructura de doble hélice del ADN, han evolucionado

una variedad de estrategias de reparación que restauran la información perdida. Si es posible, las células utilizan la cadena de ADN complementaria (si no ha sido modificada) o la cromátida hermana como "plantilla" para restaurar la información original. Si no hay ninguna plantilla disponible, las células utilizan como último recurso un sistema de recuperación propenso a los errores conocidos como síntesis de translesión. (Best, 2014, págs. 2-3)

Los daños al ADN alteran la configuración espacial de la hélice y la célula es capaz de detectar estas alteraciones. Una vez que se detectan los daños, unas moléculas específicas reparadoras del ADN se adhieren al punto dañado o cerca de él, induciendo a otras moléculas a adherirse y forman un complejo que permite que tenga lugar la reparación. Los tipos de moléculas implicados y el mecanismo de reparación que se utiliza, depende del tipo de daños que haya sufrido el ADN y de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula. En respuesta a esto, las células han desarrollado sistemas de reparación del ADN, categorizados en cuatro tipos.

1.3.1 Reparación por supresión de bases (BER)

Este sistema entra en acción en los sitios donde se encuentran citosinas, adeninas o guaninas desaminadas; adeninas, guaninas o citosinas alquiladas por agentes exógenos. La presencia de este nucleótido se utiliza como biomarcador de daño oxidativo, y es un generador de mutaciones relacionadas con algunos tipos de cáncer.

El sistema utiliza dos tipos de proteínas para retirar y sustituir la base modificada (*MTH1*, *OGG1* y *MUTYH* en humanos) y endonucleasas (*APE1* en humanos). El proceso se realiza en dos etapas: 1) una glucosilasa identifica la base alterada mediante modificaciones en la estructura de la base, rompe el enlace glucosídico entre la base y la desoxirribosa y retira la base, creando una desoxirribosa que carece de base; 2) una endonucleasa AP (apurínica/apirimidínica) reconoce este sitio sin base; genera un extremo 3'-OH libre, que permite que una polimerasa de ADN inserte el nucleótido faltante; posteriormente, una ligasa sella los extremos.

La glucosilasa humana OGG1 es capaz de revisar millones de pares de bases por segundo, mecanismo de revisión rápido. (Beas, Ortuño, & Armendáriz, 2009, págs. 33-44)

1.3.2 Reparación por supresión de nucleótidos (NER)

La estructura general del ADN puede verse alterada en la doble hélice, como las generadas cuando las bases nitrogenadas reaccionan con hidrocarburos como el benzopireno, o cuando se generan dímeros entre pirimidinas adyacentes, debido a algunos químicos. El sistema NER agrupa varias proteínas (en humanos al menos 12 proteínas) que reconocen la lesión y sirven de contacto para nucleasas especializadas que retiran 12 a 30 nucleótidos, incluyendo sitios de lesión. Estas proteínas son sensores de la distorsión de la hebra, más que de cambios o alteraciones en las bases individuales. Una vez que se retiran varios nucleótidos del sitio de lesión sobre la hebra afectada, el hueco que se genera se repara mediante la acción coordinada de una polimerasa de ADN y una ligasa. (Beas, Ortuño, & Armendáriz, 2009, págs. 36-38)

1.3.3 Reparación de pares erróneos (MMR)

Tienen la capacidad de quitar nucleótidos insertados erróneamente por la polimerasa del ADN durante la replicación, previniendo así mutaciones permanentes en las células. En humanos las proteínas que participan son: MutS, MutL, MutH, helicasa de ADN II, exonucleasas (ExoI, ExoVII, ExoX y RecJ), Proteínas SSB, polimerasa de ADN III y ligasas. Estas proteínas se unen sólo a la cadena recién sintetizada, que se identifica por la carencia transitoria de metilación de las adeninas en las secuencias GATC. (Beas, Ortuño, & Armendáriz, 2009, págs. 39-41)

1.3.4 Reparación de rompimientos de la doble hebra (DBR)

Otra posibilidad de daño directo al ADN es el rompimiento físico de la doble hélice, que puede ocurrir por exposición a químicos genotóxicos y a la presencia de algunos productos metabólicos celulares.

Hay dos vías para reparar este tipo de rompimientos; la unión de extremos no homólogos (*NHEJ; non-homologous end joining*) y la recombinación entre homólogos (*HR; homologous recombination*).

El NHEJ incluye la reunión directa de los extremos rotos del ADN, con un mínimo de procesamiento de las secuencias de los extremos, lo que sugiere que este mecanismo se activa cuando no hay pérdida de nucleótidos en los extremos. En este caso, la secuencia de suceso inicia con el reconocimiento del rompimiento por el dímero *Ku70-Ku80* y cinasas de proteínas dependientes de ADN, que interaccionan entre sí para mantener los extremos muy cercanos uno del otro. La unión de una tercera proteína, *Artemisa*, y la consiguiente fosforilación de todos los componentes induce el procesamiento final de los extremos por un complejo formado por XLF, XRCC4 y ligasa IV. (Beas, Ortuño, & Armendáriz, 2009)

1.4 Fragmentación del ADN

El daño en el ADN o fragmentación del ADN es un evento común en la vida de las células, siendo el responsable de cambios en la molécula del ADN que conducen a alteraciones en la replicación y transcripción. (Ramirez & Mendoza, 2008, págs. 235-236)

La mayoría de los daños al ADN afectan a la estructura primaria de la doble hélice provocando modificaciones en las bases, pudiendo introducir nuevos enlaces químicos. Estos daños pueden ser consecuencia de procesos celulares endógenos o producidos por mecanismos exógenos. Si el daño en el ADN no es reparado puede llevar a envejecimiento, muerte celular o a una proliferación excesiva que conduce a una neoplasia. (Maestre & Patiño, 2006, págs. 133-144)

1.4.1 Efectos de la fragmentación por mutágenos

Existen mutágenos químicos que por su modo de acción pueden desencadenar una carcinogénesis afectando al ADN celular.

1.4.1.1 Carcinogénesis

La carcinogénesis involucra cambios celulares de tipo irreversible, empieza con una primera etapa siendo el agente iniciador causante de la alteración genética en el metabolismo, reparación del ADN y proliferación celular. La modificación de cualquiera de estos tres procesos puede iniciar el proceso de la carcinogénesis, algunos de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la iniciación de la carcinogénesis son: mutaciones en el genoma como transiciones, pequeñas deleciones, mutaciones puntuales de protooncogenes y/u oncosupresores y mutaciones en genes implicados en la transducción de señales celulares las cuales pueden producir alteraciones fenotípicas; como resultado de la mutación, los genes expresan proteínas alteradas que modifican la división celular y ocasionan una proliferación excesiva o reducción en la muerte celular programada (apoptosis). En la segunda etapa, el agente promotor se define como aquel compuesto químico capaz de causar la expansión selectiva de las células iniciadas. Los agentes promotores producen una alteración en la transducción de señales celulares. Por lo tanto, su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada a través de receptores específicos. En la última etapa, el agente progresor es aquel compuesto químico capaz de convertir una célula iniciada o en estado de promoción en una célula potencialmente maligna. La progresión de la carcinogénesis se puede producir también mediante la incorporación en el genoma de información genética exógena o alteraciones cromosómicas espontáneas. El estado de progresión se puede desarrollar a partir de células en estado de promoción o bien directamente a partir de células normales como resultado de la administración de dosis relativamente altas (dosis citotóxicas) de agentes carcinógenos completos. (Dominguez, 2004, págs. 4 - 7).

1.5 Personal en riesgo

En el mundo existen industrias en que la fabricación de un producto conlleva la manipulación de compuestos químicos peligrosos, y su riesgo para la salud humana implica un alto grado de toxicidad de acuerdo a las condiciones de trabajo y a la legislación de uso de cada país, dentro de estas industrias podemos citar: fábricas de pinturas, artes gráficas, farmacéuticas, fabricación de productos metálicos y plásticos, textileras, petroleras, florícolas y laboratorios de docencia e investigación donde se trabaja con

sustancias químicas tóxicas y nocivas. (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, pág. 17)

Actividades como la extracción del petróleo o las aspersiones con pesticidas, como el glifosato, han sido dos de los problemas ambientales más controversiales en el Ecuador, cuyas consecuencias continúan siendo estudiadas. Varios estudios se han enfocado en investigar los efectos causados en el ADN de individuos expuestos a hidrocarburos, siendo la extracción del petróleo la primera fuente de ingresos del país; la segunda actividad productiva más importante es la agricultura que contribuye en el crecimiento económico de la nación. A pesar de esto, existen fallas en las regulaciones del uso de pesticidas y seguridad ocupacional de los trabajadores, lo cual repercute en la contaminación ambiental y en los diferentes problemas de salud. Los resultados obtenidos en estos estudios a partir de la técnica Ensayo Cometa en personal expuesto evidencian fragmentaciones en su ADN. (Paz-y-Miño & López, 2014)

Del mismo modo otras áreas con exposición a compuestos químicos peligrosos como el área académica podrían presentar el mismo grado de fragmentación del ADN en docentes universitarios e investigadores, aspecto que se explica por la realización de prácticas de laboratorio con los estudiantes y el desarrollo científico. (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, pág. 9)

1.5.1 Laboratorios de docencia e investigación

Los productos químicos peligrosos conllevan riesgos físicos y de salud para los trabajadores en laboratorios clínicos, industriales y académicos. Estos incluyen productos carcinógenos, tóxicos, irritantes, corrosivos, sensibilizadores, hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, así como agentes que actúan en los sistemas hematopoiéticos o que dañan los pulmones, la piel, los ojos o las membranas mucosas. OSHA (Occupational Safety and Health Administration) dispone en la actualidad de reglamentos que limitan las exposiciones a 400 sustancias aproximadamente. (U.S. Department of Labor Occupational Safety and Health Administration, 2002, pág. 1)

Las normas OSHA cubren a todos los trabajadores que utilizan productos químicos peligrosos en laboratorios. “Uso en laboratorio” significa la ejecución de procedimientos químicos utilizando pequeñas cantidades de compuestos químicos en laboratorios y no como parte de un proceso de producción en un ambiente en el que las prácticas y el equipo de laboratorio son de uso común. Esta norma exige que los empleadores mantengan la exposición de los empleados a niveles iguales o menores que los niveles de exposición permisibles (PEL – Permissible Exposure Limits). (U.S. Department of Labor Occupational Safety and Health Administration, 2002, pág. 2)

Si los empleados de laboratorio utilizan productos químicos peligrosos, se debe desarrollar e implementar un plan escrito de higiene química. Además, de los procedimientos apropiados de seguridad y salud y de prácticas de higiene para productos químicos peligrosos en laboratorios, este plan debe incluir lo siguiente:

- Criterios para reducir la exposición de empleados a productos químicos peligrosos.
- Uso de equipo de protección personal.
- Disposiciones para consultas médicas.
- Medidas para proteger a los empleados de ciertos productos químicos peligrosos.
- Límites de exposición permisibles (PEL) para las sustancias peligrosas a las que se expongan los empleados.
- Ubicación y disponibilidad de material de referencia conocido que trate de peligros químicos y de su uso, almacenamiento y eliminación segura, incluyendo, pero sin limitación, las hojas de datos de seguridad de materiales.
- Asignación de un Oficial Higienista Químico, empleado capacitado que disponga de la formación de la experiencia para poder brindar una guía técnica al desarrollar e implementar el plan de higiene química. (U.S. Department of Labor Occupational Safety and Health Administration, 2002, págs. 2 - 3)

Durante las últimas décadas ha surgido una gran preocupación ambiental y de salud por los problemas que originan los compuestos químicos peligrosos. Esta preocupación que nació en los países con mayor desarrollo económico, obligó a encarar problemas de

contaminación del ambiente y sus consecuentes efectos adversos en la salud pública (Vaca, 2012, pág. 15). En los laboratorios de los centros docentes y de investigación se emplean diversas sustancias, otras se generan en los procesos realizados durante las prácticas y análisis muestral. Algunas de ellas son totalmente inocuas; otras sin embargo, y a pesar de su peligrosidad, están presentes en muchos laboratorios (Lafuente, García , Clarimon, & Cortes, 2009, págs. 12 -14).

En países como España, la exposición a agentes químicos en general, y a productos cancerígenos en particular, es una de las principales líneas de trabajo que desde la Secretaría de Salud Laboral de CCOO de Madrid se lleva a cabo, donde se han realizado diferentes estudios sobre cómo utilizar productos químicos, cancerígenos y mutágenos en las distintas actividades de la industria, los servicios y en las administraciones públicas. Estos estudios han servido para dar a conocer a los trabajadores y a sus representantes la utilización de productos nocivos para la salud, con poco o nulo control en algunos casos y que causan enfermedades que resultan a veces mortales (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, pág. 6). Las normas técnicas, obligan a los establecimientos educativos a dar un buen manejo de residuos peligrosos, se tiende al desarrollo de técnicas y estrategias para su gestión y cada universidad cuenta con fichas de seguridad de cada compuesto químico (Vaca, 2012, pág. 18). En América Latina: en Argentina, los establecimientos educativos, se acogen a la norma para el manejo de residuos peligrosos en laboratorios de ensayo y hospitales, comprometiéndose a presentar planes de manejo ambiental y someterse a inspecciones de las autoridades ambientales periódicamente (Ministerio de Salud y Ambiente, 2002, pág. 5). En el Ecuador los riesgos del trabajo se respaldan en el Reglamento de Seguridad y Salud de los Trabajadores y Mejoramiento del Medio Ambiente de Trabajo, donde se especifican Reglamentos sobre el manejo de plaguicidas y pesticidas y Normativas Técnicas sobre el uso de mercurio y plomo. Así mismo, en el en la Política de Seguridad Nacional y Salud Ocupacional, Capítulo II: del Sistema de Gestión de Seguridad y Salud, Art 11, sección B: higiene de trabajo, se menciona el “estudio de la fijación de los límites para una prevención efectiva de los riesgos de intoxicaciones y enfermedades ocasionadas por: ruido, vibraciones, temblores, radiación, exposición a disolventes y materiales líquidos, sólidos o vapores, humos,

polvos, y nieblas tóxicas o peligrosas producidas o utilizadas en el trabajo” (IESS, 2000, págs. 2 - 8).

La Ley Orgánica de Salud y el Decreto Ejecutivo 2393 sobre seguridad y salud ocupacional, cuenta dentro de su estructura orgánica con la Dirección Nacional de Ambiente y Salud (DNAS), que entre sus actividades tiene velar por la salud de las y los trabajadores del país, que puede verse afectada por diferentes riesgos presentes en los lugares de trabajo como: riesgos químicos (exposición a sustancias tóxicas en dosis peligrosas), riesgos físicos (temperatura, ruido, iluminación) y riesgos biológicos (exposición a materia orgánica en descomposición, pinchazos). (Ministerio de Salud Pública, 2014, pág. 1).

En una investigación realizada en el laboratorio de Química Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, se determinó que para cumplir con los reglamentos, normas nacionales e internacionales tales como la ISO 9001:2000, ISO 14001, OHSAS 18001, entre otras normas, es necesario que los laboratorios, ya sean estos de docencia, investigación o prestación de servicios, cuenten con un programa de higiene y seguridad. (Vaca, 2012, pág. 20)

1.5.2 Tiempo de exposición

A pesar del trabajo con un gran número de agentes mutagénicos y cancerígenos y su presencia en la mayoría de centros de docencia e investigación, las dosis y los tiempos de exposición son mínimos, lo cual hace que no se dé la importancia debida al riesgo, por el contrario, los límites de exposición permisibles deben ser requisito indispensable para la generación de un plan de higiene química en los laboratorios de enseñanza e investigación. En la industria, no aplica la poca importancia del uso de compuestos químicos, pues a veces se usa un pequeño número de sustancias pero en grandes cantidades y con tiempos de exposición mucho más largos. (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, pág. 21)

Este hecho hace que en los centros de docencia e investigación no se proceda debidamente a la hora de evaluar los riesgos en la investigación, ocasionando mareos, vómitos, cefaleas, afecciones al sistema nervioso central y en casos extremos enfermedades crónicas.

Es importante recordar que en algunos casos la inhalación prolongada de pequeñas dosis puede producir hábito y dependencia, considerando a los trabajadores que se encuentren en este caso como adictos. (WHO, 2001, pág. 5)

Se puede medir la exposición laboral a contaminantes químicos aplicando métodos objetivos por medio de la utilización de indicadores biológicos de exposición

Los indicadores biológicos de exposición permiten medir la dosis realmente absorbida de un contaminante químico por el organismo, al tener en cuenta todas las vías de entrada y absorción de los contaminantes químicos; es decir, la vía respiratoria, la cutánea y la oral. Se realizan a través de determinaciones de contaminantes químicos o de sus metabolitos en fluidos biológicos (orina, sangre, heces) o en el aire exhalado. Para poder evaluar este indicador se utilizan los valores límite biológicos (VLB) que son los valores de referencia para los indicadores biológicos asociados a la exposición global a los agentes químicos. (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, págs. 67 - 68)

Tanto los indicadores biológicos de exposición como los valores límite biológicos son publicados anualmente por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo en el documento sobre Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. Los Límites de Exposición Profesional son valores de referencia para la evaluación y control de los riesgos inherentes a la exposición, principalmente por inhalación, a los agentes químicos presentes en los puestos de trabajo y, por lo tanto, para proteger la salud de los trabajadores en una jornada normal de trabajo de 8 horas y una semana laboral de 40 horas. Estos límites no constituyen una barrera definida de separación entre situaciones seguras y peligrosas y se establecen para su aplicación en la práctica de la Higiene Industrial y no para otras aplicaciones. (Aguilar, Cañedo, Del Campo, & Gadea, 2014, págs. 9-11)

1.5.3 Equipo de protección personal

La exposición a contaminantes ambientales puede darse por inhalación, ingestión o absorción dérmica, causadas por la exposición crónica a fuentes contaminantes. La población no utiliza elementos suficientes de protección básicos que ayuden a contrarrestar los efectos negativos del contacto con los contaminantes. (Eskenazi & Castorina, 1999, pág. 991)

Los equipos de protección personal (EPP) constituyen la última barrera entre el agente químico peligroso y el trabajador, deben utilizarse cuando los riesgos no se puedan evitar o limitar suficientemente por medios técnicos de protección colectiva o mediante medidas, métodos o procedimientos de organización del trabajo. Los EPP deben ser elementos cómodos de protección para el que lo utiliza y no para productos o personas ajenas, tienen un tiempo de vida limitada por el contacto constante con agentes contaminantes. (Servicio de prevención de riesgos laborales, 2009, págs. 2-10)

La protección personal no varía la situación ambiental existente y por tanto no introduce mejora alguna en la misma. Así si se halla presente un determinado contaminante en el ambiente, éste permanece en la misma concentración e intensidad. Los EPP crean una barrera ante las propiedades físicas y químicas que presentan los compuestos químicos, disminuyendo el contacto directo con el organismo, generando así elementos fundamentales para su protección como guantes y ropa de protección (vía dérmica), mascarillas (vía respiratoria) y gafas de seguridad (vía ocular). (Servicio de prevención de riesgos laborales, 2009, págs. 25-55)

Los guantes de neopreno constituyen el equipo de protección adecuado en operaciones que se lleven a cabo con sustancias químicas, ácidos y bases y muchos productos químicos orgánicos incluidos alcoholes, aceites y tintes; poseen bastante flexibilidad y pueden utilizarse como sustituto del látex, pues ofrecen protección frente a patógenos sanguíneos y una mayor resistencia al punción. La mascarilla al ser un equipo de protección respiratoria produce incomodidad y fatiga en el trabajo de laboratorio, por lo que su uso debe estar limitado a dos horas continuas, es apropiado para la protección frente a gases y

vapores y ha de utilizarse considerando el tipo de filtro de acuerdo al tamaño de partícula del compuesto. (Servicio de prevención de riesgos laborales, 2009, págs. 40-55)

En consecuencia, la correcta utilización de equipos de protección personal, límites del tiempo de exposición y carácter genotóxico del compuesto químico evaluado por ensayos de genotoxicidad minimizarían los riesgos en el laboratorio.

1.6 Evaluación de los daños producidos al ADN

1.6.1 Ensayos *in vivo*

Ocurren o tienen lugar dentro de un organismo, refiriéndose a una experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo. Pruebas con animales y los ensayos clínicos son formas de investigación *in vivo*. Es a menudo más apropiado para la observación de efectos finales y totales para un experimento en el sujeto viviente. Aunque en la biología molecular, *in vivo* se refiere a experimentación a nivel celular, donde estas pueden ser rotas y analizadas. (Europea, 2013, págs. 3-6)

Ensayo citogenético *in vivo*, el cual evidencia aberraciones cromosómicas estructurales en condiciones que involucran la respuesta *in vivo*, y que pueden variar según la especie y el tejido. Generalmente se evalúan durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento. Con los mutágenos químicos, la mayor parte de las aberraciones inducidas son de tipo cromatídico. En este método, se utilizan células de médula ósea de mamíferos expuestos, por vías apropiadas, a las sustancias de ensayo y sacrificados a intervalos sucesivos. (Arencibia D. , Rosario, Rodriguez, López, & Díaz, 2009, págs. 8-22)

Ensayo Cometa o técnica de electroforesis unicelular que detecta fragmentaciones en el ADN debido a agentes químicos, físicos o biológicos, sobre muestras de sangre completa. (Álvarez, Ochoa, & Nina Ayala, 2003, págs. 3-4)

1.6.1.1 Linfocitos humanos

Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular en la cual el ADN está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular (fase G₀). (Arencibia & Rosario, 2009). La utilización de muestras de sangre ha sido una herramienta eficaz en la evaluación de la genotoxicidad de numerosos agentes, empleando principalmente linfocitos aislados tanto frescos como congelados. A partir de una muestra de sangre, y dependiendo del fin, se dispone de las células de dos maneras: cultivos de sangre completa y linfocitos aislados. Estos últimos son muy sensibles para el análisis del potencial genotóxico de un agente y son utilizados en sistemas *in vitro*. (Carrano & Natarajan, 1988). Por otro lado, los cultivos de sangre completa reflejan de manera más segura la situación *in vivo* al conservar los eritrocitos y otros componentes plasmáticos, importantes en la activación metabólica de pro-mutágenos o en la degradación de algunos agentes genotóxicos. (Stocker, Yamamoto, McDonagh, Glazer, & Ames, 1987, págs. 1043-1044)

Los linfocitos de sangre periférica representan un sistema ventajoso para realizar estudios de genotoxicidad ya que son fáciles de obtener, son circulantes y están en contacto con los genotóxicos; presentan un ciclo celular corto y bien establecido, poseen un cariotipo estable, son biomarcadores muy utilizados y son un sistema sensible para la evaluación de una gran variedad de daño genético a través de técnicas como: aberraciones cromosómicas, micronúcleos, ensayo cometa, etc. (Zúñiga, 2009, págs. 54-56)

1.6.2 Fundamento del Ensayo Cometa

Técnica basada en una electroforesis en gel de células individuales que permite cuantificar de forma sensible y rápida el daño en el ADN celular.

El fundamento de este ensayo para detectar daños al ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados; al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento bajo electroforesis. Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear, hacia el ánodo formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción

mayor será el daño ocasionado al ADN. (Hernández, Arencibia, & Rosario, 2010, págs. 9-18). Para entender el principio de esta técnica se sabe que el ADN ocurre como lazos atados en una matriz y está muy empaquetado en virtud de su organización en nucleosomas. El momento que la célula es sometida a detergentes durante la lisis, se permeabiliza las membranas y las proteínas nucleares son extraídas por la alta concentración de sales, a partir de ese momento el ADN queda totalmente libre y desprotegido, pero superenrollados, constituyendo lo que se denomina un nucleoide. Sin embargo, si el ADN ha sufrido rupturas, la estructura del nucleoide cambia drásticamente formando el denominado cometa, ya que las rupturas relajan el superenrollamiento de la molécula, y los lazos en lugar de quedar firmemente enlazados a la matriz nuclear quedan en libertad de extenderse durante la electroforesis (Klaude, Eriksson, Nygren, & Ahnstrom, 1996, págs. 89-96). La neutralización que sigue a la electroforesis alcalina permite el re apareamiento de las dos cadenas de ADN que conforman la cabeza del cometa, no así en la cola donde los fragmentos rotos permanecen libres, esto ha sido demostrado al teñir con naranja de acridina. Al observar los nucleoides al microscopio, si el ADN está intacto se observará una esfera fluorescente que corresponde al ADN superenrollados, pero si el ADN ha sufrido rupturas se observará un nucleoide en forma de cometa, donde la cabeza corresponde al ADN intacto y la cola al ADN fragmentado que ha migrado hacia el ánodo. La habilidad de migración del ADN está dada por su carga negativa, el tamaño y el número de extremos rotos así el largo del cometa refleja la cantidad de rupturas del ADN. (Fairbairn, Olive, & O'Neill, 1995, págs. 37-59)

“Este ensayo ha sido empleado para estudios de monitoreo en individuos ocupacionalmente expuestos a pesticidas, derivados del petróleo, químicos utilizados en la industria, anestésicos y drogas antineoplásicas”. (Dávalos, 2000, pág. 30)

1.6.2.1 Ventajas y desventajas del ensayo cometa

El ensayo cometa es una técnica muy sensible a la hora de evaluar daño en el ADN en una amplia variedad de células (50 y 15000 roturas por célula), dañadas por agentes tanto físicos como químicos. Permite establecer relaciones dosis-respuesta a bajas dosis y respecto a otras técnicas como aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas

hermanas y micronúcleos. Además es capaz de detectar daño genético y su reparación en moléculas de ADN altamente compactadas con eficacia y exactitud. (Lovell & Omori, 2008, págs. 171-182)

Es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa una gran ventaja sobre otras técnicas citogenéticas, además puede ser aplicado virtualmente en cualquier célula eucariota, lo que permite la evaluación de las células directamente expuestas al mutágeno químico. Pero también posee desventajas como la sensibilidad ya que está ligado a su gran variabilidad, estas variaciones pueden verse reflejadas en los resultados. Las variables que afectan a la técnica son: la concentración de la agarosa y de las soluciones, el pH, la duración de la desnaturalización y electroforesis, concentración del colorante y el observador. El ensayo no detecta efectos aneugénicos (desplazamiento de cromosomas en la anafase), los cuales pueden ser claves en el desarrollo de un proceso de carcinogénesis. Una de las desventajas más relevantes radica en el desconocimiento de los principales mecanismos de formación del cometa y en saber hasta qué punto el cometa refleja el daño genético ocurrido. (Manar, y otros, 2004, págs. 2-3)

A pesar de las desventajas, la técnica del cometa ha sido ampliamente valorada y adoptada a nivel mundial, aplicándose a numerosas áreas, desde la genética toxicológica a la epidemiología molecular en humanos. (Dhawan, Bajpayee, & Parmar, 2009, págs. 23-24)

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

Para determinar los efectos de la exposición a mutágenos químicos, se evaluaron dos grupos: individuos laboralmente expuestos a mutágenos (GEm) e individuos no expuestos (GNc). Cada individuo firmó un consentimiento informado en el que se incluye información del trabajo de investigación, así como la donación de una muestra de sangre inicial y de ser necesario una segunda muestra por ser una vía de fácil acceso y extracción sencilla y estar de acuerdo en formar parte del estudio a realizarse con la garantía de ser informado sobre los resultados obtenidos (anexo 1).

Además, cada individuo (GEm y GNc) llenó una ficha informativa (anexo 2) en la cual se especifica edad, sexo, ocupación, hábitos y antecedentes clínicos familiares; así como también el tipo de mutágeno químico al que está expuesto, clasificándolos en inorgánicos y orgánicos, equipo de protección personal (EPP) utilizado y el tiempo de exposición a los diferentes químicos.

El método empleado para la evaluación del daño en el ADN fue la técnica conocida como Ensayo Cometa-alcálico, que tiene la capacidad de detectar fragmentaciones provocadas por la exposición a agentes genotóxicos a través de nucleoides observados bajo el microscopio; 200 nucleoides fueron analizados al azar por individuo, 100 por placa, cada uno de los nucleoides fueron agrupados en primera instancia por análisis visual, y posteriormente asignándoles un rango que los clasificó por nivel de daño en 5 categorías basándose en la publicación de (Anderson D. , Yu, Phillips, & Schmezee, 1994), con algunas modificaciones de acuerdo a la cantidad de ADN en la cola del cometa: nulo (<20,00µm), bajo (20,00 a 44,99 µm), medio (45,00 a 69,99 µm), alto (70,00 a 94,99 µm) y total (>95,00 µm), considerando que solo existen nucleoides en el nivel de daño nulo y cometas a partir del nivel de daño bajo (figura 4).

Clasificación de cometas por categoría y longitud

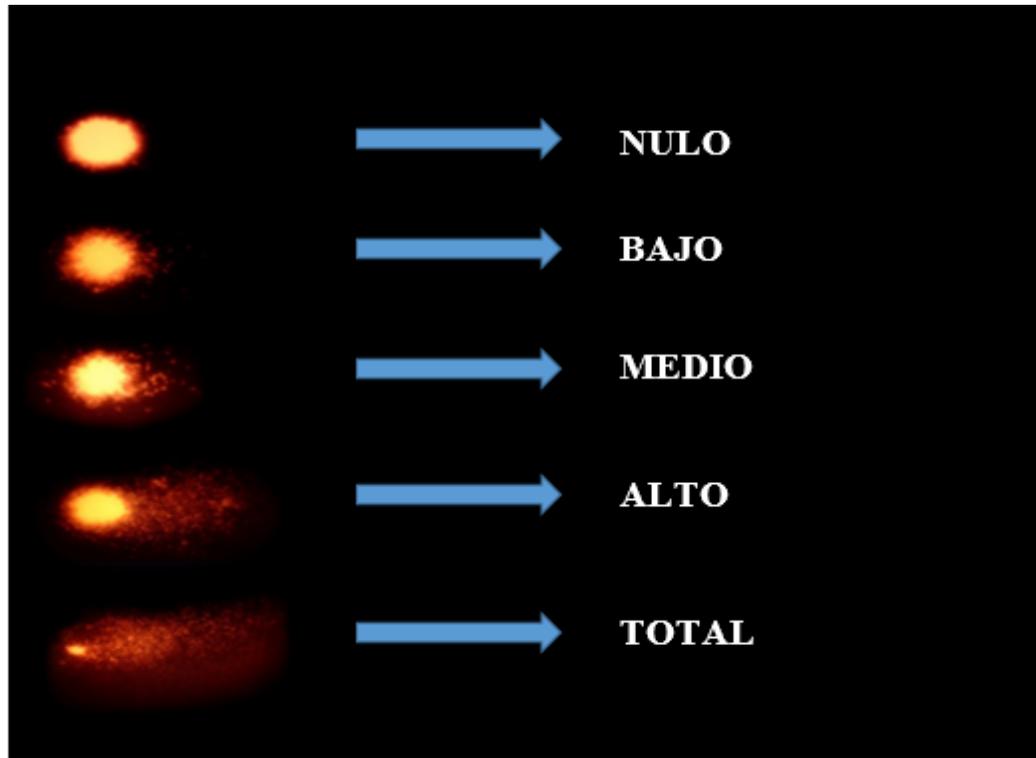


Figura 4. Categoría nulo, no hay fragmentación (<20,00 μm); categoría bajo (20,00- 44,99); categoría medio (45,00-69,99); categoría alto (70,00-94,99); categoría total (>95,00)
Elaborado por: Bonilla A., González A, 2015.

Para la identificación de los compuestos químicos se clasificó de acuerdo a su origen orgánico e inorgánico, además del carácter mutagénico se optó por la clasificación realizada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) y ha dividido a las sustancias carcinogénicas en tres categorías: primera categoría, sustancias que, se sabe, son mutagénicas; segunda categoría, sustancias que pueden considerarse como mutagénicas para el hombre; tercera categoría, sustancias cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes (Bartual, 1999) (anexo 3)

2.1 Muestras biológicas

Se tomaron muestras de sangre periférica de individuos voluntarios que laboran en 6 centros de docencia e investigación de la ciudad de Quito y de individuos voluntarios no expuestos a mutágenos químicos.

El grupo control fue conformado por individuos de edad y sexo similar al grupo expuesto, habitantes de la misma área geográfica y sin exposición a algún mutágeno químico.

La extracción de sangre periférica fue realizada por una persona capacitada en el área de flebotomía; se tomó 5 ml de sangre por cada individuo en tubos de vidrio vacutainers heparinizados, los cuales se colocaron en un contenedor frío en posición vertical. El traslado del material biológico se realizó inmediatamente desde el lugar de toma de muestra hacia el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas (UDLA).

A cada muestra se le asignó un código, anteponiendo las letras “E” para los individuos expuestos y “C” para los individuos controles no expuestos, manteniendo en el anonimato a los sujetos en estudio. Cada muestra de sangre fue procesada por duplicado inmediatamente después de su recolección, tomando 5 µl de sangre por placa para la realización del Ensayo Cometa.

2.1.1 Ensayo Cometa

El protocolo propuesto por *Singh et al.* (1988) fue adaptado y publicado por “Industrial Toxicology Research Centre” (ITRC). En el Ecuador se ha instaurado el protocolo de Ensayo Cometa desde el año 2008 (Paz y Miño, Creus, Cabré, & Leone, 2008), con algunas modificaciones (anexo 4).

Para el protocolo de Ensayo Cometa se utilizó 5µl de sangre periférica la que se colocó sobre una placa con 80µl de LMP agarosa, se colocó un cubreobjetos y se lleva a 4 °C durante 8 minutos. Después de este tiempo las placas fueron retiradas de refrigeración, se retiró el cubreobjetos con cuidado y se colocó 85µl de LMP agarosa, se cubrió y llevó a 4°C por 8 minutos para solidificarse.

Para continuar con la fase de lisis, las muestras se colocaron bajo luz roja, se retira el cubreobjetos y se las sumergió en solución de lisis por 1 hora a 4°C en la oscuridad.

Después de la hora las placas se sacaron y se lavaron con tampón de electroforesis (anexo 4).

Previo a la corrida las placas se colocan por 20 minutos en tampón de electroforesis en una cámara de electroforesis horizontal marca Owl Easy Cast TM, transcurrido el tiempo se conectaron los electrodos a la fuentes de poder a 300 mA con un voltaje de 22-25 V dejando correr 20 minutos más. Concluido este paso, se pueden deshidratar las placas para fijarlas y conservarlas hasta dos semanas después, o teñirlas con bromuro de etidio (30-50 μ l) para observarlas máximo cinco días.

Se analizó cada una de las muestras en microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX 51 utilizando el objetivo 40X. Se contabilizaron 200 nucleoides, no tomándose en cuenta los nucleoides al borde de la placa, sólo los del centro de la placa debido a que no se usa cámara de electroforesis con buffer recirculante. (Tice, y otros, 2000) Se midió la longitud del cometa desde el punto más proximal (lado del cátodo) al más distal (lado del ánodo), utilizando una regla propia del programa CellSens Dimension, que permitió clasificar a cada nucleoide en las respectivas categorías de nivel de daño.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Factores de riesgo

Se analizaron 30 individuos voluntarios 16 hombres y 14 mujeres de edad promedio 35 ± 7 años que trabajan en diferentes laboratorios de docencia e investigación dentro la ciudad de Quito y que han estado expuestos a mutágenos químicos (GEm); los individuos realizan sus actividades en las áreas de química, genética y control de calidad de plaguicidas; además se incluyeron 10 individuos voluntarios 5 hombres y 5 mujeres cuya edad promedio fue de 37 ± 7 años, considerados como controles ya que no estuvieron expuestos a compuestos químicos (GNc).

Dentro de los factores de riesgo que pueden incidir en la fragmentación del ADN, se consideró el tipo de mutágeno químico, equipo de protección personal (EPP) y el tiempo de exposición al agente (anexo 5).

3.1.1 Compuestos químicos a los que se encuentran expuestos

De los individuos expuestos a mutágenos químicos 16 individuos estuvieron en contacto con ácidos inorgánicos, ácido nítrico perteneciente a la lista de carcinogénicos de categoría III (sustancias posiblemente carcinogénicas para el hombre pero sin información suficiente para una evaluación satisfactoria), ácido sulfúrico, clorhídrico y sulfhídrico que no pertenecen a ningún grupo mutagénico ni carcinogénico; 8 individuos estuvieron expuestos a hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno y xileno), siendo el benceno un compuesto carcinogénico; 4 individuos estuvieron en contacto con bromuro de etidio considerado mutagénico y posiblemente carcinogénico; 5 individuos expuestos a metales como cadmio, níquel y plomo compuestos considerados cancerígenos; 1 individuo expuesto a cromato de potasio y 3 a dicromato de potasio, compuestos químicos considerados carcinogénicos (figura 5)

Compuestos químicos a los que los individuos están expuestos.

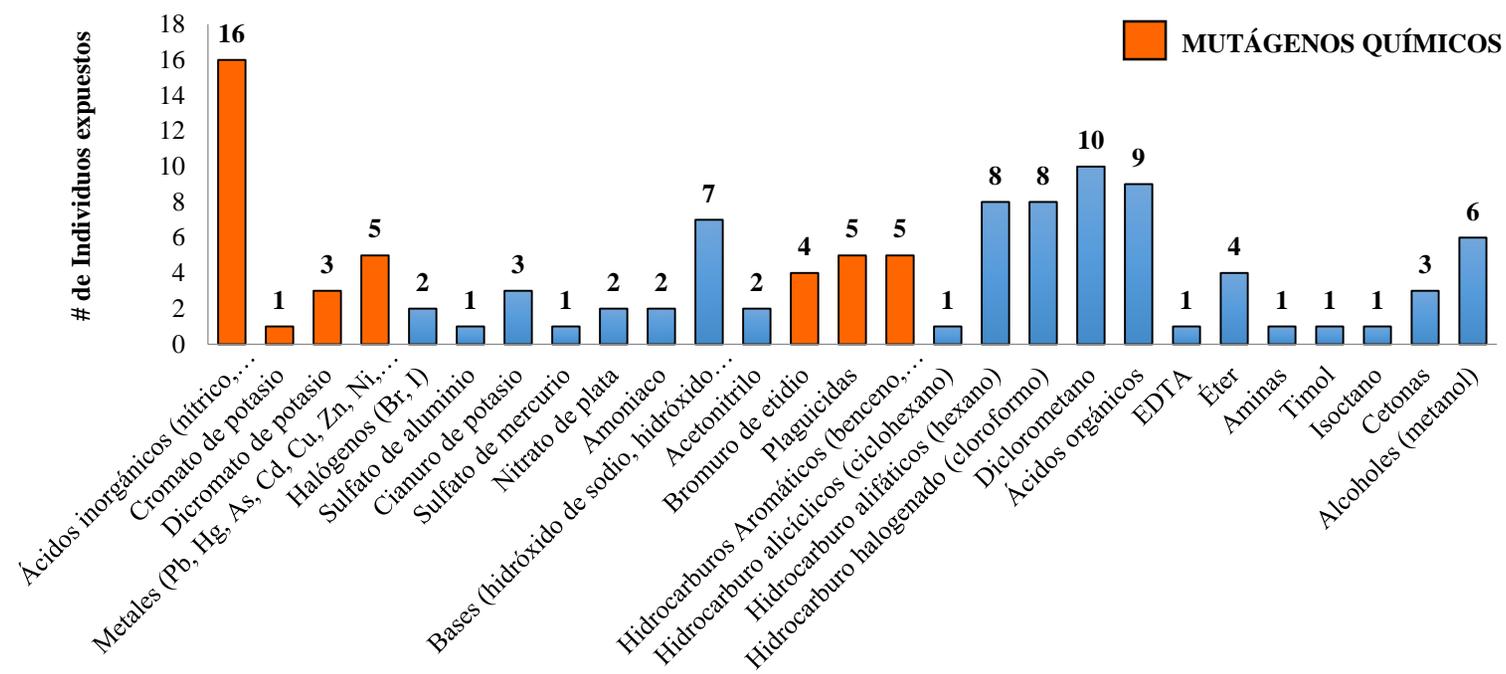


Figura 5. Los ácidos inorgánicos son los compuestos químicos a los que 16 de 30 individuos en estudio han estado expuestos. Elaborado por: Bonilla A, González A, 2015.

3.1.2 Tiempo de exposición

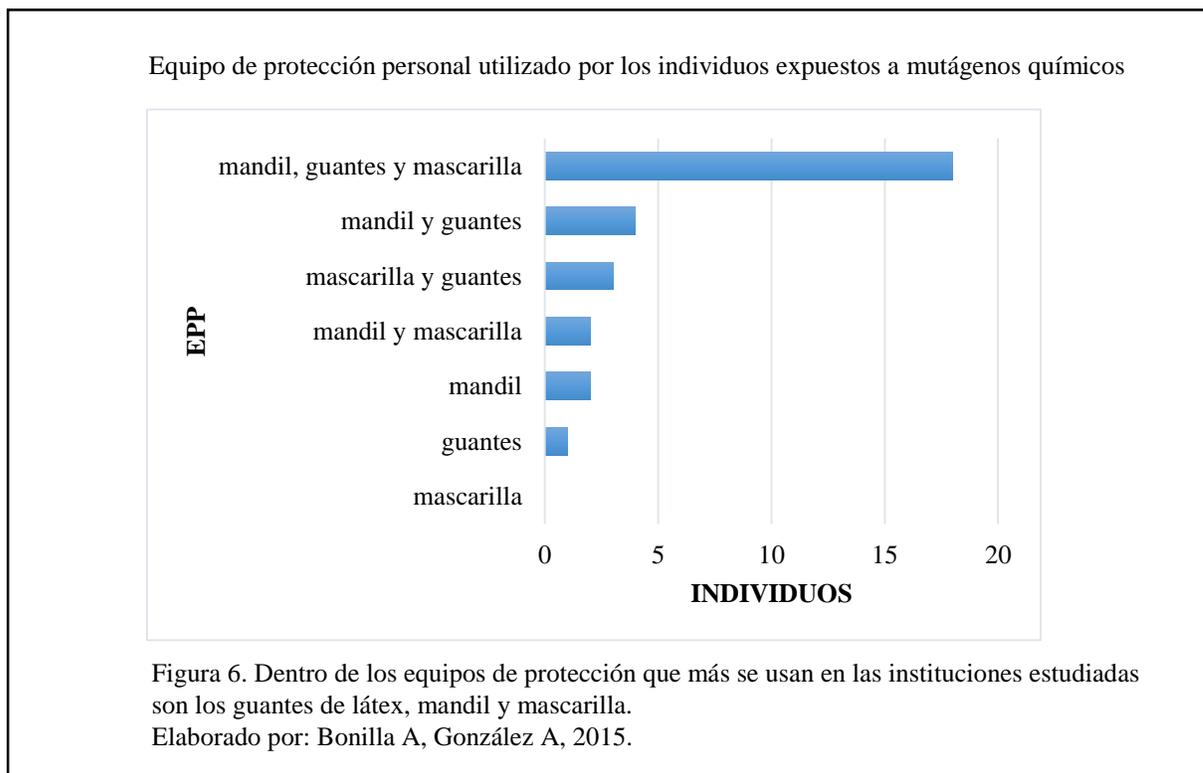
El personal que labora en los laboratorios se ha expuesto a químicos un promedio de 36 horas a la semana, con jornadas de \pm 8 horas diarias.

Se pudo encontrar individuos con 12 meses hasta 33 años de trabajo en laboratorio.

3.1.3 Equipo de protección personal (EPP)

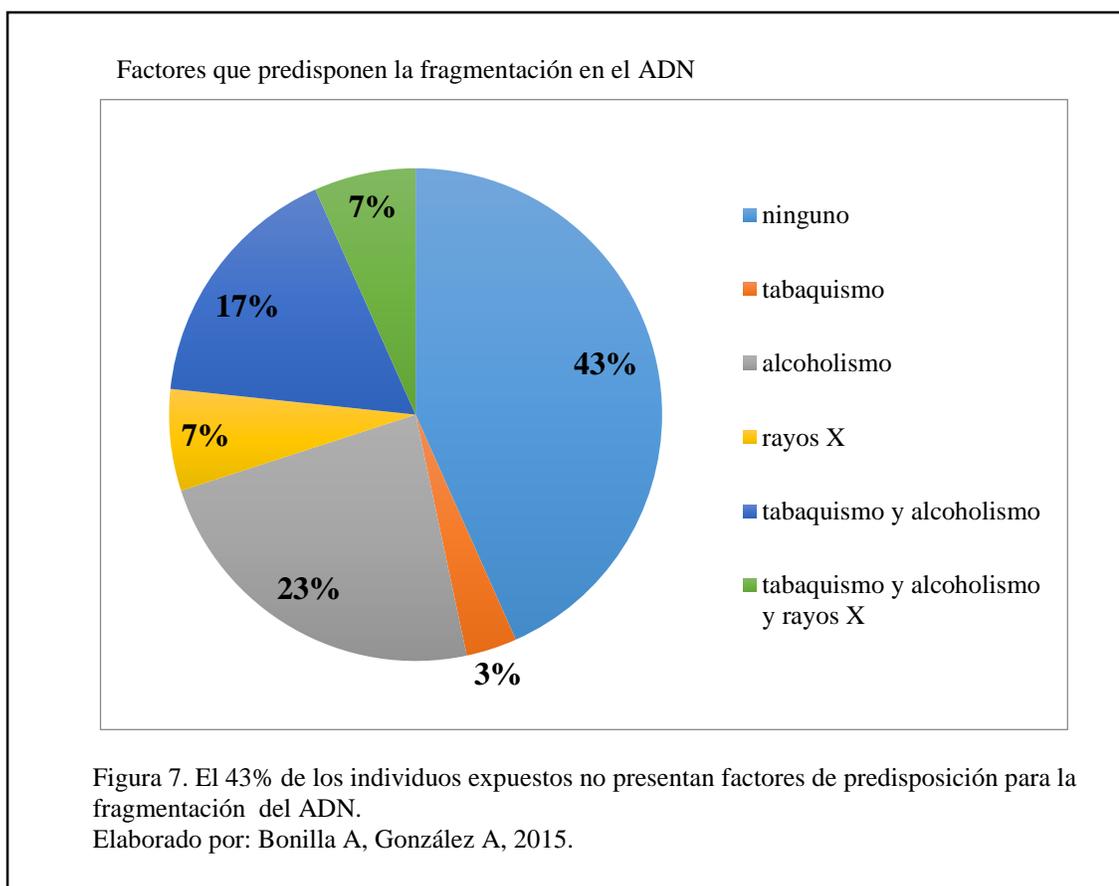
Debido a la exposición por inhalación y contacto con la piel, para esta investigación consideramos que el mandil, guantes y mascarilla son elementos básicos para trabajar con mutágenos químicos.

En los laboratorios visitados se pudo observar que 17 individuos usan los tres equipos de protección básicos, los otros investigadores al menos usan un elemento de protección (figura 6).



3.1.4 Factores que predisponen la fragmentación del ADN

Considerando que existen factores predisponentes que pueden afectar la calidad del ADN se investigó en los dos grupos el consumo de tabaco y alcohol. En los individuos expuestos, se encontró que 13 individuos (43%) no consumen alcohol ni tabaco, ni estuvieron expuestos a rayos X. 7 individuos (23%) consumen alcohol; 1 individuo (3%) es fumador activo; 5 individuos (17%) son fumadores activos y también consumen alcohol; 2 individuos (7%) estuvieron expuestos a rayos X de 2 a 6 meses antes de la toma de muestra de sangre. La exposición a rayos X también se ha demostrado que fragmenta el ADN, 2 individuos (7%) estuvieron expuestos a rayos X, son fumadores activos y también consumen alcohol. Estos datos se pueden observar en la (figura 7). Para la identificación de cada uno de los individuos se adjunta el (anexo 6).



3.2 Fragmentación en el ADN detectado por el ensayo cometa y su relación con factores de riesgo

El daño encontrado con relación a la distribución de la migración del ADN, evidencia que los individuos expuestos a mutágenos químicos (GEm) tienen mayor fragmentación con respecto al grupo control (GNc) (figura 8). El grupo control presenta un promedio de 190 nucleoides mientras que el GEm presentó un nivel de daño nulo con un promedio de 165 nucleoides.

En cuanto a la observación en niveles de fragmentación bajo, medio y alto, el grupo expuesto presenta mayor número de nucleoides en estos niveles comparado con el grupo control. En el nivel de daño bajo se pudo observar que el GEm presentó un promedio de 25 nucleoides y el GNc alcanza solamente un promedio de 6 nucleoides; el nivel de daño medio en el GEm tiene un promedio de 8 nucleoides y el grupo control de 3 nucleoides; el nivel de daño alto en el GEm presenta un promedio de 2 nucleoides mientras que el GNc presentó un promedio de 1 nucleoide.

Finalmente en el nivel de daño total se pudo observar cometas, solo en dos individuos del grupo expuesto. El número de nucleoides en los diferentes niveles se pueden visualizar en el (anexo 7).

Niveles de fragmentación del ADN

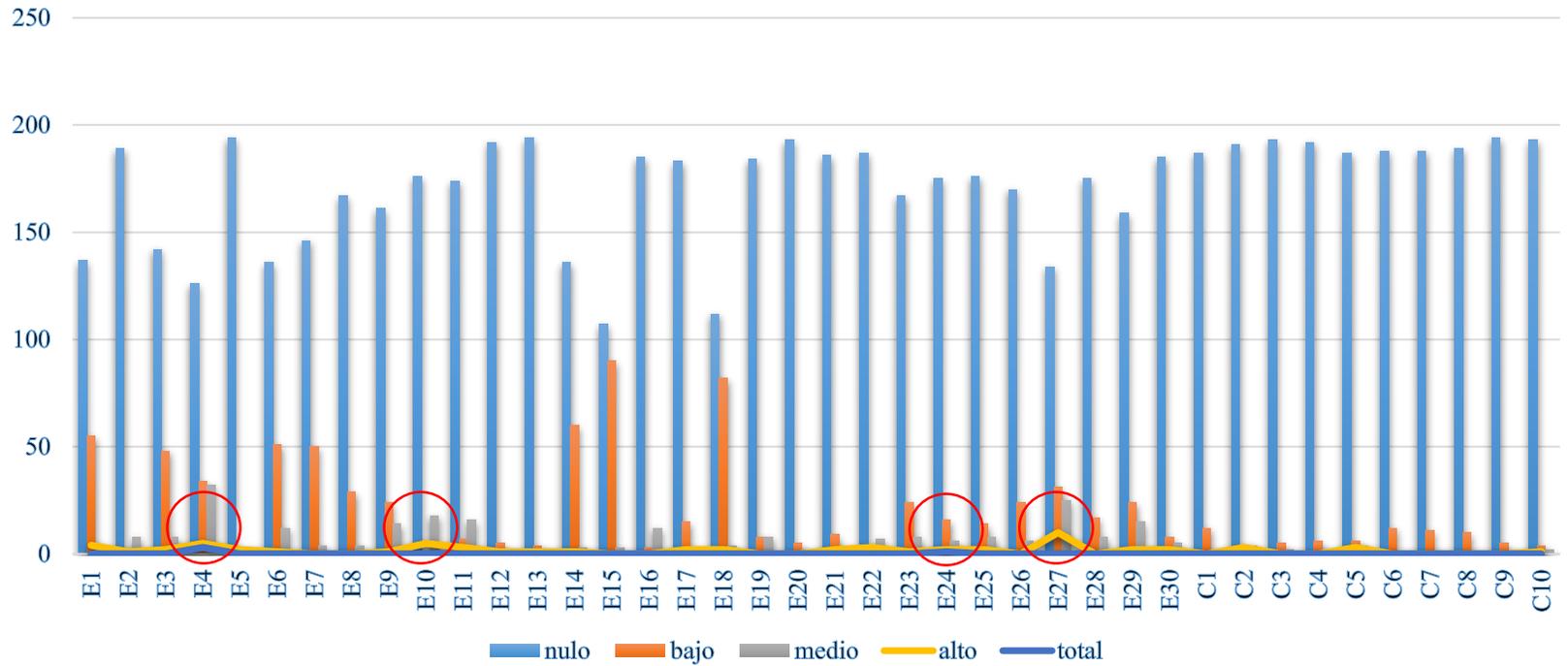


Figura 8. Los individuos expuestos (E) presentan fragmentación en el ADN en todas las categorías, predominando un nivel de daño nulo y bajo, en contraste con los individuos controles donde la mayor parte de nucleoides no presentan daño alguno. Elaborado por: Bonilla A, González A, 2015.

El análisis estadístico realizado con la prueba de Levene revela diferencias significativas entre el grupo control y el expuesto para los niveles de daño nulo ($p=0,000$), bajo ($p=0,002$), medio ($p=0,012$), mientras que en los niveles de daño alto y total no existen diferencias significativas, debido a que los niveles de significancia fueron mayores a 0,05.

La prueba de Kruskal-Wallis descarta que la edad de los individuos expuestos pueda influir en la fragmentación del ADN $p= >0,05$ en todos los niveles.

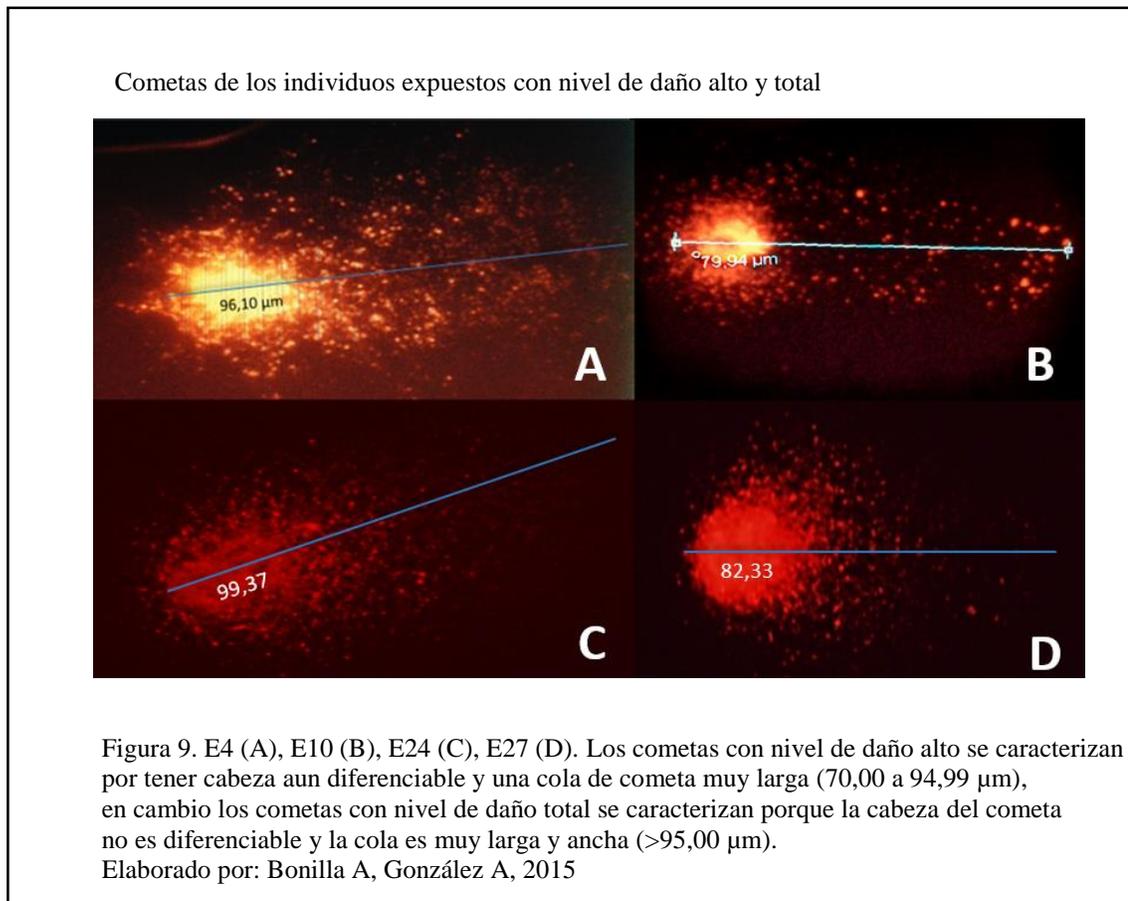
Para evaluar el tiempo de exposición se consideró horas a la semana y años de exposición laboral a mutágenos químicos, con respecto a horas a la semana se realizó una correlación de Spearman donde se evidenció que no hay diferencias en los niveles de daño ya que $p>0,05$ en todos los nivel de daño, por lo tanto no hubo correlación. Con respecto a los años de exposición, de la misma forma no mostraron diferencias significativas con la prueba de Kruskal-Wallis.

Para el análisis con respecto a los compuestos químicos, se los clasificó en 3 categorías de acuerdo a la exposición: orgánicos (1), inorgánico (2) y orgánico-inorgánico (3). Para calcular las relaciones mutágeno químico-fragmentación del ADN se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis donde se demostró que no existen diferencias significativas en todas las categorías de nivel de daño.

La correlación entre el equipo de protección personal (EPP) y fragmentación del ADN fue analizada mediante una prueba de T de Student para igualdad de medias, así como los factores que predisponen la fragmentación en el ADN, revelando que no hay diferencias significativas, debido a que los niveles de significancia fueron menores a $p=0,005$

A pesar que no existió diferencias significativas entre factores de riesgo y factores predisponentes con la fragmentación del ADN se pudo observar que los individuos E4, E10, E24 y E27 (figura 9) presentan una cifra considerable en la categoría de nivel de daño alto y total.

Los individuos mencionados anteriormente estuvieron expuestos a disolventes orgánicos y ácido nítrico. Todos tienen un tiempo de exposición mayor a 6 años.



Los individuos E3, E5, E15, E29 y E30 no utilizaron guantes y mascarilla, elementos considerados necesarios en este estudio para manipular compuestos químicos, los individuos E3 y E5 se expusieron a ácido nítrico y a disolventes orgánicos como el benceno y dicromato de potasio; el individuo E15 estuvo expuesto a plomo, ácido nítrico y dicromato de potasio; por último, los individuos E29 y E30 estuvieron expuestos a bromuro de etidio.

Los individuos E11, E13, E23 y E28 estuvieron expuestos a rayos X, alcanzando niveles de daño medio-alto, además estuvieron expuestos a bromuro de etidio, ácido nítrico y cromato de potasio y presentan un promedio de 6 años de exposición a estos compuestos químicos. El individuo E9 estuvo expuesto a acetonitrilo y plaguicidas, el individuo E22

estuvo expuesto a acetonitrilo y ácido acético ambos con un promedio de tiempo de exposición de 3 años. Los individuos E2, E6, E16 y E17 presentaron consumo de tabaco y alcohol y estuvieron expuestos a ácido nítrico, plaguicidas, cromato de potasio y metales, excepto el individuo E17.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Los compuestos químicos ocupan un lugar muy importante en nuestro entorno. Algunos cumplen propósitos útiles y traen grandes beneficios a nuestras vidas y a nuestra salud. Otros sabemos que son peligrosos, y muchos de ellos nunca han pasado evaluaciones apropiadas, para saber si son seguros. Se sabe que hoy en día estamos expuestos de manera indiscriminada a diferentes sustancias peligrosas entre ellas contaminantes químicos que podrían estar afectando la molécula de ADN. Estudios de los niveles de concentración de sustancias tóxicas en el cuerpo humano indican, de hecho, que todos estamos sometidos a exposiciones continuas de la acción de contaminantes químicos. Esta exposición, tal y como demuestran numerosos estudios científicos, está relacionada con el incremento de enfermedades del sistema reproductor y endócrino, algunos tipos de cánceres, alergias y asma. (Lafuente, García, Clarimon, & Cortes, 2009, págs. 13-14). En los laboratorios de docencia e investigación se emplean diversos químicos; otros se generan en los procesos realizados durante las “prácticas” y “análisis” de muestras, algunas de ellas son totalmente inocuas; otras sin embargo, y a pesar de su peligrosidad, han seguido presentes en muchos laboratorios por acciones rutinarias; estos compuestos son susceptibles de provocar daños a las personas que los manipulan. En este estudio se pudo evidenciar que los compuestos que mayormente utiliza el personal de laboratorio son: ácidos orgánicos e inorgánicos, diclorometano e hidrocarburos.

Conociendo tales consecuencias, el determinar la cantidad de daño en el material genético provocado por la exposición a agentes genotóxicos, constituye un método temprano para evaluar el riesgo a desarrollar enfermedades genéticas o cáncer. Al realizar el biomonitoreo a una población expuesta a mutágenos químicos permitió la identificación de daño en el ADN obteniendo como resultado general que existen diferencias significativas entre el grupo expuesto (GEm) y el grupo control (GNc) una fragmentación nula en el GEm a pesar que existen otros niveles de daño que podrían afectar la integridad

del ADN, por lo tanto es necesario implementar medidas de control, PARA evitar un daño más significativo en la molécula de ADN.

Los mutágenos químicos no mostraron tener diferencias significativas con la fragmentación parcial encontrada en esta investigación, sin embargo se pudo encontrar que individuos expuestos disolventes orgánicos presentaron niveles de fragmentación altos, estableciendo que el daño en el ADN se puede dar por una exposición a corto o largo plazo según el tipo de mutágeno químico, como el benceno y el acetonitrilo citados en el “Listado Nacional De Sustancias Químicas Peligrosos De Toxicidad Crónica” (Aguña, 2012, pág. 5), así como el ácido nítrico, bromuro de etidio, cromato y dicromato de potasio, plomo y cadmio consideradas mutagénicos y cancerígenos (Aguilar, Cañedo, Del Campo, & Gadea, 2014, págs. 53,111,117,151); otros de los compuestos a los que los individuos E6, E7, E8, E9 y E10 estuvieron expuestos fueron plaguicidas y derivados de petróleo, este último contiene gran variedad de agentes de diverso poder toxicológico como el benceno, tolueno, xileno e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Las evidencias científicas obtenidas en la investigación realizada en San Carlos, provincia de Orellana sobre el daño en el ADN, en individuos expuestos a hidrocarburos presentaron alto riesgo carcinogénico y mutagénico. “El análisis, desarrollado mediante la prueba ensayo cometa, permitió determinar que los individuos expuestos a los hidrocarburos presentaron alto porcentaje de daño en el ADN comparado con individuos sanos considerados como control” (Paz-y-Miño & López, 2014, pág. 205), de la misma forma en plaguicidas también llamados pesticidas se realizó un estudio a personas expuestas a glifosato en la frontera norte del Ecuador, donde se obtuvieron como resultados que:

Los individuos expuestos a las aspersiones aéreas con glifosato presentaron mayores niveles de migración del ADN a diferencia de los individuos control, estos resultados demostraron que los plaguicidas, al ser genotóxicos, generan fragmentación del ADN en mayor intensidad en personas expuestas con respecto a personas no expuestas al paquete herbicida con glifosato. (Paz-y-Miño & López, 2014, pág. 223).

Comparando los estudios mencionados, se observó que en los dos casos, la exposición a hidrocarburos y plaguicidas considerados genotóxicos; generan un alto porcentaje de fragmentación en el ADN en personas expuestas.

Con relación al tiempo de exposición no hubo diferencias significativas con la fragmentación del ADN, sin embargo el individuo E1 tiene el mayor tiempo de exposición (33 años) a disolventes orgánicos, alcanzando niveles de daño alto, resultando como una posible causa de fragmentación.

Por otro lado debido a que los individuos estudiados utilizan al menos un elemento de protección se podría decir que no hubo influencia en el uso de este equipo con la fragmentación del ADN. El uso de mascarilla es indispensable para proteger de la emisión de gases y vapores que han de utilizarse según su carácter específico de acuerdo al tipo de filtro; el tipo de material con el que se fabrican los guantes para manipular distintas sustancias químicas es importante conocer, ya que el 20% de la patología laboral constituyen las afecciones cutáneas, por ello los guantes de neopreno presentan resistencia a compuestos químicos como el acetonitrilo, benceno y ácido nítrico. (Servicio de prevención de riesgos laborales, 2009, pág. 12)

Los individuos E11, E13, E23 y E28 estuvieron expuestos a rayos X, se conoce que este factor es un tipo de mutágeno físico capaz de fragmentar el ADN como se comprueba en el estudio realizado por (Dávalos, 2000, pág. 77), donde cita:

Que el incremento en el daño en el grupo expuesto analizado con relación al grupo control se debe a la exposición ocupacional al agente genotóxico físico (rayos X), lo cual confirma los efectos perjudiciales sobre el material genético derivado directamente de los efectos físicos y químicos de la exposición a este tipo de radiación, es por esto que posiblemente los individuos que estuvieron expuestos al mutágeno físico presentaron niveles medio y alto de fragmentación.

El consumo de tabaco no demostró estar asociado a la fragmentación parcial del ADN, a pesar que se conoce que el tabaco se compone de hidrocarburos policíclicos aromáticos capaces de afectar el ADN destruyendo o modificando las instrucciones de la célula, de tal manera que pueda ocasionar cáncer, investigación realizada en la Universidad de Minnesota y publicada en la revista *Chemical Research in Toxicology*. (Gideon St.Helen, 2011). Por otro lado el consumo de alcohol en los resultados obtenidos en este estudio no

influyó en la fragmentación del ADN, a pesar de esto existen estudios que demuestran lo contrario, uno de ellos se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Nayarit (México) realizado en colaboración con científicos de la Universidad del País vasco (UPV/EHU) sugiere que el consumo de alcohol podría afectar el ADN. Los resultados han sido publicados en la revista Alcohol, y se plantea que:

El daño por oxidación sufrido por los que bebían alcohol resultó ser mucho mayor a través de una prueba donde extrajeron el núcleo de las células linfocíticas y lo sometieron a electroforesis. Los resultados mostraron que el ADN revelaba daños superiores a los del grupo control: 8% de daños en el grupo de control, 44% en el del grupo de consumidores de alcohol” (Medicina21, 2014, pág. 2). Estos dos factores no demostraron relación con la fragmentación del ADN debido a que el consumo no es alto en todos los individuos expuestos, solo lo hacen ocasionalmente.

En España el 83,9% de los centros de enseñanza en los que se han localizado cancerígenos no existen equipos de protección personal (Pastor, Moreno, Palazón, Martín, & Martín, 2007, pág. 6), a pesar de que cuenta con informes detallados sobre los límites de exposición profesional para agentes químicos y un documento acerca de riesgos cancerígenos, mutágenos y químicos en los centros educativos de la Comunidad de Madrid, por el contrario en el Ecuador no se cuenta con una normativa sobre límites de exposición para agentes genotóxicos y tampoco con un manual de bioseguridad para exposición a mutágenos en las áreas de enseñanza e investigación.

La versión alcalina del Ensayo Cometa (tampón $\text{pH} > 13$) logró detectar rupturas de cadena simple (RCS), rupturas de doble cadena (RCD), y sitios álcali-lábiles que son convertidos en RCS, duplicando la sensibilidad. Teniendo en cuenta que los sitiosapurínicos o apirimidínicos que se generan durante la reparación por escisión de bases son sitios álcali-lábiles, el ensayo cometa detecta también de manera indirecta modificaciones o daños en las bases nucleotídicas, si el mecanismo de reparación no ha concluido (Tice, y otros, 2000, págs. 206-221). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que se lograron visualizar cometas claros y definidos, lo que permitió la correcta clasificación de los mismos en cinco categorías de nivel de daño del ADN, desde nulo hasta total; para lograr

una buena visualización y clasificación fue necesario una correcta fase de lisis donde se dejaron reposar las placas, para que los lazos de ADN se relajen logrando una exitosa electroforesis, en la que no se contó con una cámara de tipo recirculante, a pesar de esto no se contabilizaron los cometas encontrados en los bordes de las placas. En la fase de tinción todo depende de la concentración del bromuro de etidio (mientras más diluido, mejor) para lograr un buen backup; a pesar de que este colorante sea un agente intercalante no afectó el superenrollamiento y la denaturación de las moléculas de ADN; como ya se había demostrado por (Olive, Woldek, Durand, & Banath, 1992, págs. 259-267). En la observación de los nucleoides se utilizó el lente de 40X y una escala de 20 μm para medir los cometas clasificados por medio del software cellSens Dimension, puesto que el microscopio no disponía de una regla graduada.

CONCLUSIONES

El personal de laboratorios de docencia e investigación se encuentra principalmente expuesto a ácido nítrico, benceno, cromato y dicromato de potasio, bromuro de etidio y plomo, los cuales están entre los compuestos considerados mutagénicos y carcinogénicos según el CIIC.

El equipo de protección personal no influyó en la fragmentación de la molécula del ADN, aunque 13 de los 30 individuos no utilizaban la indumentaria básica para el trabajo en laboratorio.

El tiempo de exposición a mutágenos químicos no influyó en la fragmentación el ADN, a pesar que el personal de laboratorio se encuentran laborando en promedio 36 horas semanales.

Se encontraron diferencias altamente significativas entre el grupo expuesto y el grupo control, lo que evidencia que la exposición a mutágenos químicos podría estar relacionada con la fragmentación del ADN.

Los factores que predisponen la fragmentación del ADN del personal expuesto a mutágenos químicos no estuvieron relacionados con niveles de daño en el ADN.

RECOMENDACIONES

Dar seguimiento a los agentes genotóxicos encontrados en esta investigación, como posible causa de la fragmentación del ADN en pro de un análisis de riesgo genotóxico.

Atender a otros factores que podrían estar relacionados con la fragmentación del ADN como la dosimetría, los límites de exposición y los agentes genotóxicos biológicos.

Para mejores resultados de daño en el ADN se sugiere realizar un análisis citogenético o a nivel molecular, capaz de detectar las lesiones finales producidas por el mutágeno químico.

Para nuevas investigaciones se sugiere trabajar con una mayor cantidad de población con el fin de fortalecer los resultados de este estudio.

La técnica de Ensayo Cometa, como un método de biomonitoreo eficiente capaz de medir bajos y altos niveles de fragmentación en el ADN.

Los resultados obtenidos a partir del biomonitoreo sugieren analizar detalladamente, tanto los factores de riesgo como las variables en cada individuo, debido a que no existe un nivel de daño significativo a nivel grupal.

Para disminuir el riesgo de daños al ADN por exposición a agentes genotóxicos se debe intensificar la aplicación de las buenas prácticas de laboratorio.

Medidas de prevención, regulación y control a la salud ocupacional del personal de laboratorio con el uso de manuales de bioseguridad.

Se propone realizar un examen biomédico continuo a los individuos voluntarios en estudio para su seguridad laboral a cargo de un médico genetista.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abrevaya, X. (20 de Agosto de 2008). *IntraMed*. Obtenido de IntraMed:
<http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=47111>
- Aguilar, A., Cañedo, D., Del Campo, G., & Gadea, E. (2014). *Límites de exposición profesional de agentes químicos en España*. Madrid: Ministerio de Seguridad Social e Instituto de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- Aguña, M. (2012). *Acuerdo Ministerial del Ambiente-suplemento-registro oficial N° 856*. Quito: Ministerio del Ambiente.
- Álvarez, C., Ochoa, S., & Nina Ayala, M. A. (2003). *Mutagénesis. Prueba Cometa*. Guadalajara, México: Cucba.
- Anderson, D., Yu, T., Phillips, B., & Schmezee, B. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research*, 261-271.
- Anderson, D., Yu, T., Phillips, B., & Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. En *Mutation Research* (págs. 261-271).
- Arencibia, & Rosario. (2009). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Retel*, 24-41.
- Arencibia, D., Rosario, L., Morffi, J., & Curveco, D. (2003). Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel*, 23-36.
- Arencibia, D., Rosario, L., Rodríguez, Y., López, Y., & Díaz, D. (2009). Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos. *Retel*, 8-22.
- Bartual, J. (1999). *Productos químicos carcinogénicos; sustancias y preparados sometidos a la Directiva 90/394/CEE*. Madrid: Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo.
- Beas, C., Ortuño, D., & Armendáriz, J. (2009). *Biología Molecular, Fundamentos y aplicaciones*. En S. J. López, *Reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA)* (págs. 33-44). México, D.F.: McGraw-Hill.

- Best, B. (6 de Octubre de 2014). Reparación del ADN. *Wikipedia, la enciclopedia libre*, págs. 2-3. Obtenido de Reparación del ADN:
http://es.wikipedia.org/wiki/Reparaci%C3%B3n_del_ADN
- BVSDE. (2008). Obtenido de <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/eco/025901/025901-03.pdf>
- Camacho, G. S., Morán, J., Betancourt, Luna, M. d., & Benítez, M. (2008). Centro de investigación biomédica. *Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con peróxido de hidrógeno a linfocitos de sangre periférica in vitro*. México.
- CancerQuest. (2008). Fármacos Genotóxicos. Atlanta, Estados Unidos.
- Carrano, A. V., & Natarajan, A. T. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques . *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens*, 379-406.
- Carrano, A., & Natarajan, A. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. En *International Commission for Protection Against Enviromental Mutagens and Carcinogens* (págs. 379-406). Mutation Research.
- CD, K., JB, W., Casarett, & Doull. (2005). *Fundamentos de toxicología*. España: McGraw-Hill Interamericana de España.
- CentredeArtigo. (2014). Obtenido de El bromuro de etidio, Estructura, la química, la fluorescencia, Aplicaciones, Riesgos para la salud, Manipulación y eliminación:
http://centrodeartigo.com/articulos-para-saber-mas/article_41305.html
- CEPIS. (2002). Introducción a la toxicología de la contaminación del aire. Lima: CEPIS.
- Ching-Hung, & Stedeford, T. (2010). En *Cancer Risk Assessment: Chemical Carcinogenesis: Hazard Evaluation and Risk Quantification* (págs. 312-314). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc .
- Collins, A., Dusinska, A., Franklin, M., Somorovskova, M., Petroskova, M., Duthie, H., . . . Vaughan, K. (2004). Comet Assay in human biomonitoring studies; Reliability, validation, and applications. *Enviromental and Molecular Mutagenesis*, 139-146.
- Córdova, R. A. (2014 de Abril de 2014). *Scribd*. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/221469169/Riesgos-Quimicos>

- Corporación Ekosocial. (2012 de Abril de 2012). *Regimen laboral y seguridad social*.
Obtenido de <http://incontable.com/node/458>
- Dávalos, M. V. (2000). *Aplicación del ensayo cometa en el biomonitorio genético en un población ocupacionalmente expuesta a rayos X*. Quito: PUCE.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., & Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, 5-32.
- Diaz R, L. D. (2004). Complex effects of Ras proto-oncogenes in tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 535-39.
- Diaz, N., & Vega, D. (16 de Octubre de 2012). *Slideshare*. Obtenido de Agentes Químico Mutagénicos: http://es.slideshare.net/dani_jam/agentes-mutagenicos-15106321?related=1
- Dominguez, L. (2004). *Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal*. Telde-España: Biocancer.
- E-Centro. (2012). *Genotoxicidad, Mecanismos, Técnicas de Ensayo, Cáncer*. Obtenido de http://centrodeartigo.com/articulos-enciclopedicos/article_84206.html
- Escribano. (2009). Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudios citogenéticos. *Hospital Clínico*, 8.
- Eskenazi, B., & Castorina, R. (1999). Association of prenatal maternal or postnatal child environmental tobacco smokes exposure and neurodevelopmental and behavioral problems in children. *Environ Health Perspect*, 991–1000.
- Europea, C. (2013). *Métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud*. Obtenido de http://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/annex5b_es.pdf
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, O. (1995). The comet assay: A comprehensive review. *Mutation research*, 37-59.
- FAO. (1995). Evaluación de los riesgos asociados a agentes químicos presentes en los alimentos. En *Aplicación del análisis de riesgos a cuestiones de normas alimentarias*. Ginebra: OMS.
- Four, A. D., Larebeke, N. V., & Janssen, C. (2004). Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders. *Belgium.Mut Res*, 155–67.
- Fuertes, M. S. (2011). *Hepatopatías Tóxicas laborales*. Barcelona, España.

- Gideon St.Helen, M. L. (2011). Exposure and Kinetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cigarette Smokers. *Chemical Research in Toxicology*, 952–964.
- Green, S., Keller, H.-M., & Schinke, R. (1996). Vibration–rotation excitation of CO by hot hydrogen atoms: Comparison of two potential energy surfaces. *AIP*, 105.
- Hanson, M., Gratton, & Bardeen, J. (2006). *Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin*. California: ELSEVIER.
- Hermoso, R. (2012). *Scribd*. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/96258348/Tema-toxigenetica>
- Hernández, T., Arencibia, D., & Rosario, L. (2010). Evaluación de la genotoxicidad mediante el ensayo de dominantes letales, un artículo técnico. . *Retel*, 9-18.
- Herraéz, Á. (2012). Biología molecular e ingeniería genética. En *Bases moleculares de la mutación y la reparación del DNA* (págs. 383-404). Barcelona: Elsevier.
- Herrero, O., & Peña, E. d. (2004). Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad. Madrid, España: CSIC.
- Ibarra, E. (2010). Toxicología en Salud Ocupacional. *INST*, 68-149.
- IESS. (2000). Normas INEN 2288. Productos químicos Industriales Peligrosos. Etiquetado de precaución. Requisitos. *Seguro General de Riesgos del Trabajo*. Quito, Pichincha, Ecuador: HAZARDOUS INDUSTRIAL CHEMICALS.
- ILCE. (2013). *Cómo se identifican los agentes genotóxicos*. México D.F.: Organismo Internacional.
- Jiménez, R., & Kuhn, R. (2009). *Toxicología fundamental*. Madrid: Díaz de Santos.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., & Ahnstrom, G. (1996). The comet assay: Mechanisms and technical considerations . *Mutation Research*, 89-96.
- Kornberg, A., & Baker, T. (2000). *NCBI*. Obtenido de DNA Lesions That Require Repair: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21554/table/A3236/>
- Koss, G., & Tesseraux, I. (1999). Toxicology. *Academia Press*, 603-44.
- Lafuente, G., García , A. E., Clarimon, L., & Cortes, A. (2009). *Guia laboratorios docentes*. Zaragoza: Departamento de Medios Ambiente de Comisiones Obreras de Aragón .
- Levine, A. (1993). The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem*, 623 -51.

- López, A. (2003). Estudio de la inestabilidad genómica espontánea e inducida en mutantes deficientes en la reparación del ADN de *Drosophila melanogaster*. 2003. Barcelona, España.
- Lovell, D., & Omori, T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. *NCBI*, 171-182.
- Maestre, & Patiño. (2006). Daño y reparación del ADN. En *Biología de la célula* (págs. 133-144). Medellín: Biogénesis.
- Manar, M., Al-Moneef, Benedict, T., Sherwood, J. K., Bowman, R., PSymonds, & Kilian, J. (2004). *AACR*. Obtenido de <http://www.aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/abstract/2004/1/356-a>
- Martín, M., & Domingo, J. (27 de Septiembre de 2011). *SciELO*. Obtenido de Carcinogénesis: <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v53n5/a08v53n5>
- Martínez, C., & G.S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de contaminación Internacional*, 15.
- Medicina21. (7 de Enero de 2014). *El consumo de alcohol podría afectar al ADN desde muy pronto*. Obtenido de http://www.medicina21.com/Actualidad-V3886-El_consumo_de_alcohol_podria_afectar_al_ADN_desde_muy_pronto.html
- Ministerio de Salud Pública. (28 de abril de 2014). *Somos salud*. Obtenido de Día mundial de la salud y seguridad ocupacional: <http://instituciones.msp.gob.ec/somossalud/index.php/enterate/531-28-de-abril-dia-mundial-de-la-seguridad-y-salud-ocupacional>
- Ministerio de Salud y Ambiente. (2002). *Ley Nacional 25.612 Gestión integral de residuos industriales y de actividades de servicios*. Buenos Aires.
- Olive, P., Banath, J., & Durand, R. (1989). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. *Radiation Research*, 86-94.
- Olive, P., Woldek, D., Durand, R., & Banath, J. (1992). Factors Influencing DNA migrations from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 259-267.

- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. En *Biochemistry and Biophysics Research Communications* (págs. 291-298).
- Pastor, V., Moreno, M. d., Palazón, R., Martín, E., & Martín, P. (2007). *Riesgos cancerígenos, mutágenos y químicos en los centros educativos de la Comunidad de Madrid*. Madrid: Unigráficas, GPS.
- Paz y Miño, C., Creus, A., Cabré, O., & Leone, P. (2008). Genética Toxicológica y Carcinogénesis. En C. Paz y Miño, M. V. Dávalos, P. Leone, M. Arévalo, & E. Sánchez, *Ensayo Cometa* (págs. 241-245). Quito: Fundacyt.
- Paz-y-Miño , C., & López, A. (2014). Genética Molecular y Citogenética Humana. En C. Paz-y-Miño, & A. López, *Investigaciones Moleculares en el Ecuador: Genotoxicología* (págs. 205-223). Quito: YACHAY EP.
- Paz-y-Miño, C., Dávalos, V., Sánchez, M. E., Árevalo, M., & Leone, P. E. (2002). should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutat Res*, 57-61.
- Quintero, M., Ruiz, A. M., & Ortiz, I. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*, 33-41.
- Ramirez, C., & Browner, W. (2004). Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo del cáncer. *Biología Tropical*, 6.
- Ramirez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. México, D.F.: SEMARNAT. Obtenido de Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo.
- Riedberg, B., & Johanson. (1978). Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. En *DNA Repair Mechanisms* (págs. 465- 468). New York, USA: Academic Press.
- Rodriguez, & Rosario. (2009). *Las toxinas ambientales y sus efectos geneticos*. México: Fondo De Cultura Economica USA.
- Rodriguez, R. (1995). *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos*. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- Rosa, M. E., & Ruiz, L. (1990). *Mutagénesis y Carcinogénesis Ambiental*. México, D. F.: UNAM.

- Rutten, Schmitz, Gerlach, & Oyen. (2007). The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss? *Neurobiology of Aging*, 91-98.
- SEAP. (2014). *Instituto Nacional de Salud*. Obtenido de https://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=70095491-8951-4290-90c0-b4f37e830be9&groupId=10157
- Seoánez, M. (2002). *Tratado de la contaminación atmosférica problemas, tratamiento y gestión*. Madrid: MundiPrensa.
- Servicio de prevención de riesgos laborales. (2009). *Equipos de protección individual en el Laboratorio*. Madrid.
- Servicio de prevención de riesgos laborales del CSIC en Sevilla. (2007). *Manual de Buenas prácticas de laboratorio*. Sevilla: CSIC.
- Singh, N., M.T, M., & Schneider, E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 184-191.
- Sociedad Americana de Química. (2002). Comité de seguridad Química de la Sociedad Americana de Química. *Seguridad en los Laboratorios Químicos Académicos*.
- Solans, X., & Hernández, M. R. (1999). Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas. *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. España.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A., Glazer, A., & Ames. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *NCBI*, 1043-6.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmean, A., Cobayashi, H., . . . Sasaki, Y. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Enviromental Molecualr Mutagenesis*, 206-221.
- U.S. Department of Labor Occupational Safety and Health Administration. (2002). *OSHA*. Obtenido de Hazardous Chemical in Labs: https://www.osha.gov/OshDoc/data_General_Facts/hazardouschemicalsinlabs-factsheet.html
- Vaca, L. S. (diciembre de 2012). *Elaboración del manual para el adecuado manejo de residuos químicos peligrosos en la Facultad de Ciencias Químicas*. Quito, Pichincha, Ecuador: Facultad de Ciencias Químicas.

- Vázquez, G., & R-F. (2008). Universidad San Francisco de Quito, Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública . *Alteraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a benceno en una refinería de petróleo en Ecuador*. Quito.
- Vázquez, J. (2001). Pruebas de biocompatibilidad de polímeros sintéticos y microbianos. Iztapalapa, México.
- Vilenchik, & Knudson. (2000). *Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates*. USA: Proc Natl Acad Sci.
- Watson, Baker, Ball, Gann, Levine, & Losick. (2008). Biología Molecular del Gen. En *La mutabilidad y la reparación del DNA* (págs. 253-278). Madrid: Panamericana.
- WHO. (2001). *Air quality guidelines for Europe 2001*. Barcelona: Copenhagen.
- Wolf, Fasanella, S., Tedesco, B., Cavallini, G., Donati, A., Bergamini, E., & Cittadini, A. (2005). Peripheral lymphocyte 8-OHdG levels correlate with age-associated increase of tissue oxidative DNA damage in Sprague-Dawley rats. En *Protective effects of caloric restriction* (págs. 181-188). Exp Gerontol.
- Zuluaga, M., Valencia , A. M., & Ortiz, I. C. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*, 33-41.
- Zúñiga, L. (Octubre de 2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Barcelona, España.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado para individuos expuestos a mutágenos químicos e individuos control.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: Alteraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a mutágenos químicos.

Sr. (Sra., Srta.):

El propósito de este documento es entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda decidir libremente si desea participar en la investigación que se le ha explicado verbalmente, y que a continuación se describe en forma resumida:

Resumen del proyecto:

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno. En la actualidad se registran más de 6 millones de sustancias químicas mutagénicas, muchas de las cuales son utilizadas en los laboratorios de enseñanza e investigación, en donde a pesar de conocer los riesgos que involucra el trabajo no se hace un buen manejo de prácticas de laboratorio.

La evaluación preventiva de la salud de los trabajadores expuestos a agentes químicos mediante pruebas de genotoxicidad pondrán en evidencian alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta por agentes químicos.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar y caracterizar las alteraciones cromosómicas presentes en el personal de laboratorio de enseñanza e investigación expuesto a mutágenos químicos mediante pruebas citogenéticas y de esta manera poder incorporar medidas de prevención de riesgos, a la lucha contra los accidentes laborales y diseñar estrategias de prevención y control.

Yo _____, al respecto, expongo que:

Previamente al inicio de la investigación he sido informado/a sobre el estudio a desarrollar y que se tomará una muestra de sangre inicial y de ser necesario se podrá tomar otra muestras, previo a mi consentimiento.

He sido también informado/a en forma previa a la toma, que los procedimientos que se realicen, no implican costo alguno para mi persona.

Junto a ello he recibido una explicación satisfactoria sobre el propósito de la investigación, así como de los beneficios sociales o comunitarios que se espera éstos produzcan.

Conozco los riesgos y la protección que debo tener al trabajar con mutágenos químicos por lo que, deslindo de cualquier responsabilidad a la institución en la que laboro o he laborado, por los resultados obtenidos del análisis de mi muestra de sangre.



Estoy en pleno conocimiento que la información obtenida con la investigación en la cual participaré, será absolutamente confidencial, y que no aparecerá mi nombre ni mis datos personales en libros, revistas y otros medios de publicidad derivadas de la investigación ya descrita.

Sé que la decisión de participar en esta investigación, es absolutamente voluntaria. Si no deseo participar en ella o, una vez iniciada la investigación, no deseo proseguir colaborando, puedo hacerlo sin que existan repercusiones negativas para mí.

Adicionalmente, los investigadores responsables, Germania Karolys y Mónica Ruiz, han manifestado su voluntad para aclarar cualquier duda que me surja sobre mi participación en la investigación realizada. Para ello, se me informa que el teléfono 0999839905 Dra. Mónica Ruiz o al 0998752104 Germania Karolys podrá atenderme en el horario comprendido entre las 14:00 a las 19:00 horas, en el período comprendido en la investigación y hasta 6 meses después de concluida ésta.

He leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él y por lo cual firmo libre y voluntariamente como constancia de mi consentimiento para participar en la investigación.

Recibiendo en el acto una copia de este documento ya firmado.

Yo,, Cédula de identidad o pasaporte N°....., de nacionalidad....., mayor de Consiento en participar en la investigación denominada: "Alteraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a mutágenos químicos", y autorizo Germania Karolys Gutiérrez, investigadora responsable del proyecto y/o a quienes éste designe como sus colaboradores directos y cuya identidad consta al pie del presente documento, para realizar los procedimientos requeridos por el proyecto de investigación descrito.

Fecha:/...../.....

Hora:

Firma de la persona que consiente:

Investigador responsable : Germania Karolys Gutiérrez
Nombre

Firma

Co-investigador 1 : Wilson Tapia Hernandez
Nombre

Firma

Co-investigador 2 : Mónica Ruiz
Nombre

Firma

Técnica de Investigación 3 : Abigail Gonzalez
Nombre

Firma

Anexo 2. Ficha Informativa para individuos expuestos a mutágenos químicos e individuos control



Proyecto: Alteraciones de la fragilidad cromosómica en trabajadores expuestos a mutágenos químicos.

FICHA INFORMATIVA

E14

CODIGO: 019

INFORMACIÓN GENERAL			
Nombres	Martin Alejandro	Apellidos	Ortiz Levallos
Edad	28 años	Sexo	Masculino
Dirección de domicilio	Thomas Zaccan E16-102 Esmeraldas	Laboratorio	CICAM
Teléfono (convencional/celular)	2609413 0980642367	Estado civil	Soltero
INFORMACIÓN ESPECÍFICA			
Tipos de Consumo (marcar con una X):			
Alcohol	<input checked="" type="checkbox"/>	Desde qué edad:	12 años
		Frecuencia:	1 vez cada 15 días
Tabaco	<input type="checkbox"/>	Desde qué edad:	
		Frecuencia:	
Otras drogas	<input type="checkbox"/>	Desde qué edad:	
		Frecuencia:	
Medicamentos que consume (enumerar): Ninguno			
1.		2.	
3.		4.	
5.		6.	
Razones:			
En los últimos meses ha estado expuesto a (marcar con una X): No			
Rayos X	<input type="checkbox"/>	Horas a la semana	Meses
Quimioterapia	<input type="checkbox"/>	Horas a la semana	Meses
Razones:			

Área y tipo de Laboratorio en el que trabaja:			
Laboratorio de ensayo de calidad del agua.			
	Horas a la semana	Meses	
	40	5 meses	
Químicos a los que ha estado y está expuesto:			
	Horas a la semana	Meses	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
Tipo de Equipo de Protección Personal (enumerar):			
1.	Mascarilla con filtros 3M 6003	2.	
3.	Gauchos de Nitrilo	4.	
5.		6.	
Presenta alguna enfermedad crónica? Cuál?		Presenta alguna enfermedad genética? Cuál?	
1.	No	1.	No
2.		2.	
3.		3.	
En su familia existe alguna persona con enfermedades crónicas?		En su familia existe alguna persona con enfermedad genética?	
1.	No	1.	No
2.		2.	
3.		3.	

Anexo 3. Lista de compuestos químicos

Compuesto químico	Vía de acceso	Efecto
Hidrocarburos aromáticos ORGÁNICOS		
Benceno	Inhalación, ingestión, cutánea.	<p>Por inhalación niveles altos: afecta al sistema nervioso central; por niveles bajos; mareos, dolor de cabeza, confusión e inconsciencia.</p> <p>Por contacto: irritación a la piel y daños en la córnea.</p> <p>Se ha demostrado que causa alteraciones cromosómicas in vivo en diversas especies, incluido el ser humano. Agente desencadenante de la leucemia y del desarrollo de tumores hematológicos, considerado carcinogénico.</p>
Tolueno	Ingestión o inhalación	<p>Irritante para la piel y tracto respiratorio. Dolor de cabeza, fatiga y náuseas.</p> <p>Los estudios de exposición prolongada por inhalación en ratas y ratones no han demostrado la capacidad cancerígena del tolueno. Los ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i> fueron negativos, mientras que los resultados de ensayos <i>in vivo</i> fueron contradictorios en lo relativo a alteraciones cromosómicas. El CIIC ha concluido que no existen suficientes pruebas de la capacidad cancerígena del tolueno en el ser humano.</p>
Xileno	Inhalación	<p>Irritación de la piel, ojos y garganta; dificultad respiratoria, alteraciones de memoria, molestias de estómago y problemas renales y hepáticos, dolores de cabeza.</p> <p>Los estudios de carcinogénesis a largo plazo no han mostrado pruebas de</p>

		<p>su capacidad cancerígena. Los resultados de las pruebas de mutagenia realizadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> han sido negativos.</p>
Metales pesados INORGÁNICOS		
Cromo	Ingestión, inhalación	<p>Irritación a la nariz, hemorragias nasales y asma. En altas concentraciones cáncer pulmonar en trabajadores expuestos. Con su ingestión causa trastornos estomacales y úlceras, convulsiones, problemas al riñón, hígado. El cromo VI es considerado bajo pruebas de genotoxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> muestra ser cancerígeno.</p>
Plomo	Inhalación, ingestión	<p>La exposición de largo plazo puede conducir a alteraciones cognitivas, debilidad en manos y tobillos, hipertensión, daños cerebrales y renales. En trabajadores expuestos han encontrado que puede causar cáncer de pulmón, estómago y cerebral.</p>
Mercurio	Inhalación e ingestión	<p>Irritabilidad, cambios en la vista/audición y problemas de memoria y Parkinson. El conjunto de las pruebas indica que el cloruro de mercurio (II) puede aumentar la incidencia de algunos tumores benignos en los tejidos afectados y que posee una actividad genotóxica débil pero no causa mutaciones puntuales.</p>

Níquel	Inhalación, ingestión	Bronquitis crónica, la reducción de la función pulmonar y el desarrollo de los tipos de cáncer de mama y pulmón. En altísimas concentraciones produce dolores de estómago, aumento de glóbulos rojos y de las proteínas en orina. El potencial carcinógeno parece deberse al sulfato de níquel y las combinaciones de sulfuros de níquel y óxidos.
Cadmio	Inhalación	Problemas pulmonares, renales y fragilidad de los huesos. Tos e irritación leve de garganta. Considerado cancerígeno.
Ácidos INORGÁNICOS		
Ácido nítrico	Ingestión e Inhalación	Produce asfixia, mareos e hipertensión arterial; por ingestión: dolor abdominal fiebre, vómito, dolor de garganta. Considerado carcinogénico de categoría III por el CIIC.
Sales de metales pesados INORGÁNICO		
Cromato de potasio y Dicromato de potasio	Ingestión e Inhalación	Considerados carcinogénicos de categoría I y II, pero mutagénicos de categoría II por el CIIC.
Otros ÓRGÁNICO		
Bromuro de etidio	Inhalación e Ingestión	Produce Tos y dolor de garganta. Por ser un agente intercalante del ADN, tiene un poderoso efecto mutagénico y posiblemente carcinogénico y teratogénico.

Nota: compuestos químicos orgánicos e inorgánicos considerados mutagénicos y carcinogénicos, teniendo en cuenta la vía de acceso y los efectos que producen en el ser humano, de acuerdo al INHST y el CIIC.

Anexo 4. Procedimiento estandarizado de operaciones- Ensayo Cometa

Preparación de Soluciones (un día antes)

Las soluciones duran aproximadamente 2 semanas después de su preparación, pues tienden a degradarse sus componentes.

Normal melting point 0,6%

- 01g en 120ml PBS 1x
- Diluir en la placa térmica hasta que esté transparente (300°C)

Low melting point 0,5%

- 0,05g en 10ml de PBS 1x
- Disolver en la placa térmica (120°C)
- Llevar a la estufa a 37°C

Tampón de lisis (Solución Stock)

- Para 400ml

Solución de lisis	380ml
NaCl 2,5M	58,44g
Na ₂ EDTA 100mM	14,88g
Tris 10mM	0,484g
NaOH	4,8g

Disolver en 300ml de agua destilada el NaCl, EDTA y TRIS hasta que no haya residuos de polvo, luego colocar el NaOH poco a poco para que la solución se vuelva transparente, regular pH 10, aforar a 400ml. Autoclavar. Colocar a 4°C un día antes de usar.

A cada alícuota de 50ml agregar al momento:

DMSO	10%
TRITON X-100	1%

Llevar a 4°C una hora antes de usar.

Tampón de electroforesis (solución stock)

- Se disolvió 80g de NaOH (en perlas) en 200ml de agua destilada; se agita en una probeta de 1000ml preferiblemente, sin necesidad de calor.
- Se disuelve 7,45g de EDTA (polvo) en 100ml de agua destilada, con un pH de 10.
- Preparadas las soluciones se deja enfrían en sus respectivos recipientes tapados con papel aluminio.

Para 650ml:

Na ₂ EDTA	3,25g
NaOH	19,5g

Disolver cada reactivo en agua destilada, autoclavada y fría. Regular el pH >13

Tampón de neutralización

Para 200ml:

Tris	12,3g
------	-------

Disolver en 150ml de agua destilada, regular el pH A 7,5 y aforar a 200ml. Autoclavar.

Llevar a 4°C un día antes de usar.

Bromuro de etidio

- Para 1ml:

Bromuro de etidio	20ug/ml
Solución madre	10mg/ml

Disolver en 1ml de agua destilada y autoclavada. Mantener a 4°C y en la oscuridad.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

- Colocar las placas en etanol 100% por lo menos una noche antes, a -20% (elimina residuos de grasa).
- Preparar la agarosa NMP y sumergir la placa.
- Limpiar uno de los lados de la placa con una toalla húmeda.
- Secar al medio ambiente en una bandeja cubierta.
- Guardar en una caja por un máximo de 2 semanas.
- Rotular con lápiz de carboncillo en el esmerilado de la placa.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Sangre entera

- 5µl de sangre entera con 80ul de LMP agarosa por placa.
- Se mezcla en tubo eppendorf y se resuspende la mezcla.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar la mezcla (sangre entera +LMP agarosa → resuspender aproximadamente de 3 a 4 veces) sobre la placa previamente cubierta con NMP agarosa, colocar un cubreobjetos y llevar a 4°C durante 8 minutos para que se solidifique. Mientras tanto, preparar el tampón de lisis.
2. Sacar la placa de la refrigeradora, calentar un poco y retirar con cuidado el cubreobjetos deslizándolo hacia un lado. Colocar 85ul de LMP agarosa, cubrir, llevar a 4°C por 8 min.

A partir de este momento, todo se realizará bajo luz roja.

FASE DE LISIS DE MEMBRANAS CELULARES

1. Sacar la placa, retirar el cubreobjetos y sumergirla en la solución de lisis por 1 hora a 4°C y en la oscuridad.
2. Preparar la cantidad de tampón de electroforesis necesaria con agua destilada fría, Na₂EDTA y NaOH (Solución de trabajo) recién preparada.
3. Sacar las placas de la solución de lisis y dejar inclinadas para que se sequen un poco.
4. Lavar las placas con tampón de electroforesis.

FASE DE DESNATURALIZACIÓN

(Utilizar una cubeta de electroforesis con orificios para poder regular el volumen de buffer con la ayuda de una pipeta pasteur)

1. Colocar las placas en la cubeta horizontal de electroforesis, en contacto unas con otras, evitando espacios entre ellas.
2. Llenar la cubeta de tampón de electroforesis (650ml), frío y recién preparado. Enrasar a un nivel aproximado de 0,25 cm por encima de las placas.
3. Llevar a 4°C y dejar las placas en este tampón básico durante 20 minutos.

FASE DE ELECTROFORESIS

1. Conectar los electrodos y encender la fuente de poder. Bajar al mínimo voltaje (22-25V) y ajustar el amperaje a 300mA (modificando el volumen de buffer, mayor volumen=mayor amperaje).
2. Las condiciones de electroforesis serán las siguientes: 4°C, voltaje fijo de 25V y amperaje a 300mA por 20min.

FASE DE NEUTRALIZACIÓN

1. Sacar las placas de la cubeta de electroforesis y colocarlas en una bandeja.
2. Realizar 3 lavados, por 5min cada uno, con tampón de neutralización frío.
3. (No hace falta descartar para volver a poner). Mientras tanto, preparar Bromuro de etidio.
4. Retirar el exceso de líquido de las placas.
5. Concluido este paso, se pueden deshidratar las placas para fijarlas y conservarlas para revisarlas hasta 1 semana después, ó teñirlas para observarlas en ese momento o máximo 5 días después.

FASE DE TINCIÓN

Manipular con guantes: agregar de 35 a 40ml de bromuro de etidio aproximadamente para lograr un backup negro y núcleos rojos definidos.

Fase de análisis y observación

1. Analizar 200 nucleoides por muestra (100 por placa) al microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo 40X.
2. Por convenio internacional, si no se usa cámara de electroforesis con buffer recirculante, como es nuestro caso, no se deberán contabilizar los nucleoides que estén en el borde del gel, sólo los del centro de la placa.
3. Medir la longitud del cometa desde el punto más proximal al más distal (cabeza y cola del cometa) utilizando microscopio de fluorescencia, analizar las imágenes con el programa CellSens.

DESHIDRATACIÓN Y FIJACIÓN DE PLACAS

1. Dejar de escurrir el exceso de neutralización, colocando a las placas en posición vertical.
2. Colocar las placas en posición horizontal, añadir 2ml de etanol absoluto a cada placa y esperar de 4 a 5 min.
3. Colocar las placas en posición vertical y dejar secar hasta que se evapore totalmente el etanol.
4. Guardar en una caja, para protegerlas del polvo, a temperatura ambiente por un máximo de 1 semana antes del análisis.
5. Teñir con bromuro de etidio (40ul) y colocar un cubreobjetos.

Anexo 5. Factores de riesgo de los individuos expuestos a mutágenos químicos

Individuo	Sexo	Edad	Tiempo de exposición		Mutágenos	EPP
			horas/semana	años		
E1	F	55	10	33	1	1
E2	M	58	30	25	3	1
E3	F	27	40	6	1	0
E4	F	51	30	23	1	1
E5	M	46	40	10	3	0
E6	F	27	40	2,5	3	1
E7	M	35	40	8	3	1
E8	F	29	40	3	3	1
E9	M	34	40	5	3	1
E10	M	51	40	6	3	1
E11	F	41	8	14	3	1
E12	F	27	49	1	3	1
E13	M	29	40	2	3	1
E14	M	28	40	1	3	1
E15	F	36	40	4,5	3	0
E16	M	28	40	1	3	1
E17	M	26	32	2	1	1
E18	M	46	40	1	2	1
E19	M	43	40	3	3	1
E20	F	26	40	2	2	1
E21	M	25	45	1,5	2	1
E22	M	25	40	1	3	1
E23	F	30	40	2	3	1
E24	M	44	40	10	1	1
E25	F	32	20	2	1	0
E26	F	28	40	1,5	1	1
E27	F	47	40	15	1	1
E28	M	30	40	6	1	1
E29	M	29	40	5	1	0
E30	F	23	30	1	1	0

Nota: los genotóxicos están clasificados en 2 grupos: compuestos orgánicos (1), compuestos inorgánicos (2) y orgánico-inorgánico (3). El equipo de protección se considera presente (1) al usar sólo mascarilla y guantes y ausente (0)

Anexo 6. Factores que predisponen la fragmentación del ADN en los individuos expuestos a mutágenos químicos.

Individuo	Consumo de Tabaco	Consumo de Alcohol	Exposición a rayos X
E1	no	no	no
E2	si	si	no
E3	no	no	no
E4	no	no	no
E5	no	no	no
E6	si	si	no
E7	no	no	no
E8	no	si	no
E9	no	no	no
E10	no	si	no
E11	no	no	si
E12	no	si	no
E13	si	si	si
E14	no	si	no
E15	no	no	no
E16	si	si	no
E17	si	si	no
E18	no	no	no
E19	si	no	no
E20	no	si	no
E21	no	si	no
E22	no	no	no
E23	no	no	si
E24	no	no	no
E25	no	no	no
E26	no	no	no
E27	no	no	no
E28	si	si	si
E29	si	si	no
E30	no	si	no

Nota: El término SI implica que los individuos son activos en el consumo de tabaco y alcohol y que estuvieron expuestos a rayos X. Se tomó en cuenta solamente a los individuos que estuvieron expuestos a rayos X 6 meses antes de la toma de muestra.

Anexo 7. Número de nucleoides según la categoría del nivel de daño en el ADN

GEm	Número de nucleoides por categoría				
	nulo	bajo	medio	alto	total
E1	137	55	4	4	0
E2	189	2	8	1	0
E3	142	48	8	2	0
E4	126	34	32	5	3
E5	194	2	2	2	0
E6	136	51	12	1	0
E7	146	50	4	0	0
E8	167	29	4	0	0
E9	161	24	14	1	0
E10	176	1	18	5	0
E11	174	7	16	3	0
E12	192	5	2	1	0
E13	194	4	1	1	0
E14	136	60	3	1	0
E15	107	90	3	0	0
E16	185	3	12	0	0
E17	183	15	0	2	0
E18	112	84	4	2	0
E19	184	6	8	0	0
E20	193	5	2	0	0
E21	186	9	3	2	0
E22	187	3	7	3	0
E23	167	24	8	1	0
E24	175	16	6	2	1
E25	176	14	8	2	0
E26	170	24	6	0	0
E27	134	31	25	10	0
E28	175	17	6	0	0
E29	159	24	15	2	0
E30	185	8	5	2	0
Promedio	165	25	8	2	0

GNc	Número de nucleoides por categoría				
	nulo	bajo	medio	alto	total
C1	187	12	1	0	0
C2	191	2	4	3	0
C3	193	5	2	0	0
C4	192	6	2	0	0
C5	187	6	4	3	0
C6	188	12	0	0	0
C7	188	11	1	0	0
C8	189	10	1	0	0
C9	194	5	1	0	0
C10	193	4	2	1	0
Promedio	190	7	2	1	0

Nota: Los individuos expuestos a agentes genotóxicos (GEm) se representan con el código E, mientras que los no expuestos (GNc) con el código C; los mismos que se analizaron bajo 5 categorías de nivel de daño en el ADN: nulo, bajo, medio, alto, total.

Anexo 8. Correlación entre el grupo expuesto a mutágenos químicos y grupo control

Estadísticos de grupo

Químicos		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Nula	Expuestos	30	164,9333	25,46117	4,64855
	Control	10	190,2000	2,69979	,85375
Baja	Expuestos	30	24,8333	24,16336	4,41161
	Control	10	7,3000	3,62246	1,14552
Media	Expuestos	30	8,2667	7,24418	1,32260
	Control	10	1,8000	1,31656	,41633
Alta	Expuestos	30	1,8333	2,08580	,38081
	Control	10	,7000	1,25167	,39581
total	Expuestos	30	,1333	,57135	,10431
	Control	10	,0000	,00000	,00000

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Nula	Se han asumido varianzas iguales	19,034	,000	-	38	,004
	No se han asumido varianzas iguales			3,106		
Baja	Se han asumido varianzas iguales	10,909	,002	-	38	,029
	No se han asumido varianzas iguales			5,346		
Media	Se han asumido varianzas iguales	6,962	,012	-	38	,008
	No se han asumido varianzas iguales			30,876		
Alta	Se han asumido varianzas iguales	,571	,455	-	38	,114
	No se han asumido varianzas iguales			5,346		
Total	Se han asumido varianzas iguales	2,320	,136	-	38	,469
	No se han asumido varianzas iguales			1,278		

Anexo 9. Prueba T. Correlación entre la género y el nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Estadísticos de grupo

Género		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Nula	0	16	171,3750	23,09654	5,77413
	1	14	157,5714	26,85492	7,17728
Baja	0	16	20,0000	23,85232	5,96308
	1	14	30,3571	24,17439	6,46088
Media	0	16	7,0625	5,30997	1,32749
	1	14	9,6429	8,98381	2,40102
Alta	0	16	1,5000	1,31656	,32914
	1	14	2,2143	2,72251	,72762
total	0	16	,0625	,25000	,06250
	1	14	,2143	,80178	,21429

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Nula	Se han asumido varianzas iguales	1,356	,254	1,514	28	,141
	No se han asumido varianzas iguales			1,498	25,878	,146
Baja	Se han asumido varianzas iguales	,012	,913	-	28	,248
	No se han asumido varianzas iguales			1,179	27,369	,249
Media	Se han asumido varianzas iguales	2,161	,153	-	28	,339
	No se han asumido varianzas iguales			1,178	20,502	,358
Alta	Se han asumido varianzas iguales	2,824	,104	-	28	,358
	No se han asumido varianzas iguales			1,178	18,204	,383
total	Se han asumido varianzas iguales	2,403	,132	-	28	,478
	No se han asumido varianzas iguales			1,178	15,210	,507

Anexo 10. Anova de un factor. Correlación entre la edad y el nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Nula	1	19	170,5263	19,29412	4,42638	161,2268	179,8258	136,00	194,00
	2	8	157,0000	34,07135	12,04604	128,5156	185,4844	107,00	194,00
	3	3	150,6667	33,65016	19,42793	67,0750	234,2583	126,00	189,00
	Total	30	164,9333	25,46117	4,64855	155,4260	174,4407	107,00	194,00
Baja	1	19	21,9474	18,16123	4,16647	13,1939	30,7008	3,00	60,00
	2	8	29,6250	36,13047	12,77405	-,5808	59,8308	1,00	90,00
	3	3	30,3333	26,68957	15,40923	-35,9672	96,6339	2,00	55,00
	Total	30	24,8333	24,16336	4,41161	15,8106	33,8561	1,00	90,00
Media	1	19	6,4211	4,41356	1,01254	4,2938	8,5483	,00	15,00
	2	8	10,2500	8,39643	2,96859	3,2304	17,2696	2,00	25,00
	3	3	14,6667	15,14376	8,74325	-22,9525	52,2858	4,00	32,00
	Total	30	8,2667	7,24418	1,32260	5,5616	10,9717	,00	32,00
Alta	1	19	1,1053	,93659	,21487	,6538	1,5567	,00	3,00
	2	8	3,0000	3,25137	1,14953	,2818	5,7182	,00	10,00
	3	3	3,3333	2,08167	1,20185	-1,8378	8,5045	1,00	5,00
	Total	30	1,8333	2,08580	,38081	1,0545	2,6122	,00	10,00
total	1	19	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	2	8	,1250	,35355	,12500	-,1706	,4206	,00	1,00
	3	3	1,0000	1,73205	1,00000	-3,3027	5,3027	,00	3,00
	Total	30	,1333	,57135	,10431	-,0800	,3467	,00	3,00

Pruebas no paramétricas. Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Nula	Baja	Media	Alta	Total
Chi-cuadrado	1,410	,196	1,764	5,257	5,267
gl	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,494	,906	,414	,072	,072

Anexo 11. Pruebas no paramétricas. Correlación entre horas a la semana y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

	Nula	Baja	Media	Alta	Total	HoraSemana
N	40	40	40	40	40	30
Parámetros						
Media	171,2500	20,4500	6,6500	1,5500	,1000	36,47
normales ^{a,b}						
Desviación típica	24,62722	22,27791	6,88942	1,96051	,49614	9,134
Diferencias más						
Absoluta	,208	,212	,222	,215	,530	,417
extremas						
Positiva	,178	,212	,222	,209	,530	,283
Negativa	-,208	-,191	-,167	-,215	-,420	-,417
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,318	1,338	1,406	1,357	3,351	2,285
Sig. asintót. (bilateral)	,062	,056	,038	,050	,000	,000

Correlacion de Spearman-horas semana

Correlaciones Rho de Spearman

	Nula	Baja	Media	Alta	total	horaSemana
horaSemana						
Coefficiente de correlación	,119	-,010	-,252	-,365*	-,161	1,000
Sig. (bilateral)	,531	,960	,180	,047	,397	.
N	30	30	30	30	30	30

Anexo 12. Pruebas no paramétricas. Prueba de Kruskal-Wallis. Correlación entre los años y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Nula	Baja	Media	Alta	total
Chi-cuadrado	1,667	,174	5,650	7,261	4,034
gl	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,435	,917	,059	,027	,133

Anexo 13. Pruebas no paramétricas. Prueba de Kruskal Wallis. Correlación entre mutágeno químico y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Rangos

Compuestos		N	Rango promedio
Nula	Orgánicos	11	12,73
	Inorgánicos	3	18,00
	Orgánicos/Inorgánicos	16	16,94
	Total	30	
Baja	Orgánicos	11	18,32
	Inorgánicos	3	16,17
	Orgánicos/Inorgánicos	16	13,44
	Total	30	
Media	Orgánicos	11	17,91
	Inorgánicos	3	7,17
	Orgánicos/Inorgánicos	16	15,41
	Total	30	
Alta	Orgánicos	11	19,50
	Inorgánicos	3	14,83
	Orgánicos/Inorgánicos	16	12,88
	Total	30	
total	Orgánicos	11	17,23
	Inorgánicos	3	14,50
	Orgánicos/Inorgánicos	16	14,50
	Total	30	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Nula	Baja	Media	Alta	total
Chi-cuadrado	1,762	2,029	3,557	3,940	3,574
gl	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,414	,363	,169	,139	,167

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: compuestos

Anexo 14. Prueba T. Correlación entre equipo de protección personal y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Estadísticos de grupo

EPP	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Nula 0	6	160,5000	32,15432	13,12694
1	24	166,0417	24,21189	4,94223
Baja 0	6	31,0000	33,09985	13,51296
1	24	23,2917	22,03649	4,49818
Media 0	6	6,8333	4,70815	1,92209
1	24	8,6250	7,78969	1,59006
Alta 0	6	1,6667	,81650	,33333
1	24	1,8750	2,30901	,47132
total 0	6	,0000	,00000	,00000
1	24	,1667	,63702	,13003

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Nula	Se han asumido varianzas iguales	,496	,487	-,470	28	,642
	No se han asumido varianzas iguales			-,395	6,490	,705
Baja	Se han asumido varianzas iguales	1,543	,225	,693	28	,494
	No se han asumido varianzas iguales			,541	6,153	,607
Media	Se han asumido varianzas iguales	1,021	,321	-,535	28	,597
	No se han asumido varianzas iguales			-,718	12,874	,485
Alta	Se han asumido varianzas iguales	2,370	,135	-,215	28	,831
	No se han asumido varianzas iguales			-,361	24,066	,721
total	Se han asumido varianzas iguales	1,769	,194	-,632	28	,532
	No se han asumido varianzas iguales			-	23,000	,213
				1,282		

Anexo 15. Prueba T. Correlación entre consumo de tabaco y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Estadísticos de grupo

tabaco		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	
Nula	dimension1	0	22	161,0455	26,70559	5,69365
		1	8	175,6250	19,18286	6,78217
Baja	dimension1	0	22	28,2273	25,93018	5,52833
		1	8	15,5000	16,30951	5,76628
Media	dimension1	0	22	8,3636	7,94952	1,69484
		1	8	8,0000	5,26444	1,86126
Alta	dimension1	0	22	2,1818	2,30189	,49076
		1	8	,8750	,83452	,29505
total	dimension1	0	22	,1818	,66450	,14167
		1	8	,0000	,00000	,00000

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Nula	Se han asumido varianzas iguales	2,437	,130	-	28	,169
	No se han asumido varianzas iguales			1,410	-	17,454
Baja	Se han asumido varianzas iguales	2,355	,136	1,290	28	,207
	No se han asumido varianzas iguales			1,593	20,117	,127
Media	Se han asumido varianzas iguales	,956	,336	,119	28	,906
	No se han asumido varianzas iguales			,144	19,054	,887
Alta	Se han asumido varianzas iguales	2,100	,158	1,554	28	,131
	No se han asumido varianzas iguales			2,282	27,964	,030
total	Se han asumido varianzas iguales	2,614	,117	,765	28	,451
	No se han asumido varianzas iguales			1,283	21,000	,213

Anexo 16. Prueba T. Correlación entre rayos X y nivel de daño en el ADN en individuos expuestos a mutágenos químicos.

Estadísticos de grupo

Rayos X		N	Media	Desviación tít.	Error tít. de la media	
Nula	dimension1	0	26	163,0000	26,58571	5,21389
		1	4	177,5000	11,56143	5,78072
Baja	dimension1	0	26	26,6538	25,32342	4,96633
		1	4	13,0000	9,20145	4,60072
Media	dimension1	0	26	8,2692	7,50764	1,47237
		1	4	8,2500	6,13052	3,06526
Alta	dimension1	0	26	1,9231	2,18949	,42939
		1	4	1,2500	1,25831	,62915
total	dimension1	0	26	,1538	,61269	,12016
		1	4	,0000	,00000	,00000

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Nula	Se han asumido varianzas iguales	4,891	,035	-	28	,297
	No se han asumido varianzas iguales			1,063	9,141	,095
Baja	Se han asumido varianzas iguales	2,939	,097	1,054	28	,301
	No se han asumido varianzas iguales			2,017	12,094	,066
Media	Se han asumido varianzas iguales	,317	,578	,005	28	,996
	No se han asumido varianzas iguales			,006	4,515	,996
Alta	Se han asumido varianzas iguales	,362	,552	,594	28	,557
	No se han asumido varianzas iguales			,884	6,282	,409
total	Se han asumido varianzas iguales	1,075	,309	,495	28	,625
	No se han asumido varianzas iguales			1,280	25,000	,212

