



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"EVALUACION DEL DAÑO AL ADN Y SU REPARACION EN  
PERSONAS OCUPACIONALMENTE EXPUESTAS A  
VAPORES DE GASOLINA".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A :

**CARLOS FRANCISCO AGUILAR HERNANDEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

MEXICO, D.F.

ENERO DE 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Carlos Francisco Aguilar Hernández  
FECHA: 19.01.04  
FIRMA: Carlos Aguilar Alvarado

ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A LA MEMORIA DE:

CARLOS AGUILAR ALVARADO

Y ADELA HERNÁNDEZ DE LA MADRID.

CON UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO PARA:

EL DR. EMILIO ROJAS, MAHARA, MARICARMEN Y EL  
LABORATORIO EN SU TOTALIDAD.

LOS DOCTORES REGINA MONTERO, LIBIA LOYO,  
SANDRA GÓMEZ Y RAFAEL CAMACHO.

MI FAMILIA: TERE, AMELLA, PICOS, KIKE Y VANE.

MARISSA.

SAMUEL, SILVIA, GUSTAVO Y TODA LA GENTE DE

LA "BERTRAND RUSSELL".

LUCAS, ZKRITSCH, CARLITOS Y TAK.

## **RESUMEN**

La exposición a vapores de gasolina es una realidad inherente a la vida moderna. Entre los diversos elementos volátiles hallados en la gasolina se encuentra el benceno, probado carcinógeno; además de una variedad de sustancias similares como el tolueno y el xileno, cuyo potencial carcinogénico no ha sido perfectamente dilucidado. De igual manera, el peligro potencial atribuible a la exposición a diversas mezclas de estos compuestos o la gasolina propiamente dicha no está claramente definido, y cuando ha sido estudiado, los resultados se circunscriben a un medio geográfico, un grupo étnico y un tipo de gasolina particulares. Asimismo, en la gasolina existen otros compuestos peligrosos como el acetato de plomo y el metil-terbutiléter. En el presente estudio se analizó tanto el daño basal como la capacidad de reparación del daño inducido al ADN, en sangre de tres grupos de individuos con diferentes grados de exposición. Un grupo de alta exposición (expendedores de gasolina), uno de media (trabajadores de la vía pública), y uno de baja exposición (oficinistas). Los niveles de benceno en sangre entre expendedores de gasolina fueron significativamente más altos que los de los otros grupos de exposición, sin embargo, no existen diferencias entre los tres grupos, ni en daño basal ni en reparación. Ninguna característica especial parece tener injerencia determinante en estos resultados, aunque cabe mencionar que la ingesta de alcohol es generalizada. Sin embargo, existe una correlación múltiple entre la edad, el tiempo trabajando en el mismo lugar, el número de cigarrillos fumados y las concentraciones de plomo y benceno, con la respuesta inicial de reparación (a los 25 minutos) del grupo de alta exposición. Por otro lado, al considerar todas las variables resulta evidente que el grupo de oficinistas (referencia del estudio) se encuentra expuesta a diversas sustancias (cigarro, alcohol y otros volátiles), por lo cual no se le pudo seguir

considerando como un grupo testigo apropiado. A partir de esto se decidió comparar los tres grupos de exposición contra un grupo testigo histórico, encontrando una clara diferencia entre estos tres grupos de exposición muestreados, y el histórico mencionado.

## ***ABSTRACT***

Exposure to Gasoline Vapors is an inherent condition of modern life. Among the most common volatile compounds found in gasoline is Benzene, a well known carcinogenic. Besides, there are a variety of similar compounds in gasoline, such as Toluene and Xylene, for which there is not a perfectly defined carcinogenic potential. Also, there are no clear proofs of the carcinogenic potential neither of Gasoline nor of mixtures of the solvents mentioned above. Even in other studies, the results are circumscribed to particular ethnicities, gasoline type and geographical media. There are also other dangerous compounds in gasoline such as Lead acetate and Methyl-tertbutyl-ether. In this study, both DNA basal damage and induced-damage repair were measured. This work included three experimental groups with different gasoline exposure levels: gas station attendants (high exposure), street vendors (medium), and office workers (low). There are no statistically significant differences at any level, neither for basal damage, nor for repair indexes, although the level of benzene in blood was significantly higher among gas station attendants. No special characteristics have a determining effect on these results, although there is a multiple correlation between smoking, age, years of service, benzene, lead and the initial response of the gas attendant group (by minute 25). On the other side, when considering every variable measured, it is clear that the office group (reference group for this study) is exposed to several substances such as tobacco, alcohol and other volatile compounds; therefore, it could no longer be considered a proper control group. Based upon this, it was decided to compare all three-exposure groups against an historical control group. A clear significant difference was found between these three exposure groups and the historical one mentioned above.



## ÍNDICE:

• Resumen-----	4
• Abstract-----	6
• Índice-----	7
• Introducción-----	8
• Objetivos-----	27
• Metodología-----	28
• Resultados-----	37
• Discusión-----	55
• Conclusiones-----	73
• Referencias-----	74

### Abreviaturas empleadas:

- ADN : Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA: Ácido etilendiaminatetraacético
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peróxido de hidrógeno
- NaOH : Hidróxido de sodio
- IARC: International Agency for Research on Cancer
- n.d. : no determinado
- ARNm : Ácido Ribonucleico Mensajero
- t.v.p. : trabajadores de la vía pública
- SCGE : Electroforesis unicelular
- LMA : Low melting point agarose (agarosa de bajo punto de fusión).

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.- CONTAMINACIÓN**

Para la Real Academia Española, contaminación es la “Alteración nociva de la pureza o las condiciones normales de una cosa o un medio por agentes químicos o físicos” ([www.rae.com](http://www.rae.com)), y de acuerdo con este principio, es una realidad inherente del desarrollo histórico y tecnológico de las actividades humanas.

La contaminación ambiental presenta muchos aspectos y problemáticas, aún en los países más desarrollados (incluso en cuanto a “la conciencia ambientalista”), ésta es un problema de primer orden, en parte como causa de un sinnúmero de efectos a nivel de salud pública y personal, en parte por los grandes efectos económicos que tiene para muchos gobiernos el librarse de los desechos que su industria produce, o encontrar y mover grandes volúmenes de recursos a poblaciones cada vez mayores (agua potable, por ejemplo) ([www.ine.gob.mx](http://www.ine.gob.mx)).

La contaminación ambiental tiene asimismo diversos orígenes y formas, como son la física, la biológica y particularmente, la química. El desequilibrio químico del medio implica importantes riesgos sanitarios, desde los más evidentes envenenamientos agudos en poblaciones marginadas del tercer mundo, hasta las lentas y pasivas exposiciones crónicas que sufren los habitantes de cualquier ciudad relativamente grande a una serie de sustancias que pueden provocar toda suerte de padecimientos, desde reacciones alérgicas hasta desarrollo de cánceres, enfisemas, etc. ([www.ine.gob.mx](http://www.ine.gob.mx)).

Si a esto se agregan las características distintivas de una "vida moderna", como la dieta, los trastornos del sueño, las toxicomanías (desde tabaco, café y alcohol hasta heroína o disolventes), la lista de patologías asociadas se incrementa considerablemente.

En lo particular, la Cd. de México, situada a más de 2400 m de altitud sobre el nivel del mar, poblada por más de 8 millones de personas (más de 20 millones, contando los municipios conurbanos del Estado de México que comparten la misma cuenca geográfica y que forman en conjunto la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, o ZMCM [[www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)]); rodeada casi completamente por cadenas montañosas pertenecientes al Eje Neo-volcánico Transversal, de considerable altitud; con una población de vehículos de combustión interna de más de tres millones, y una parte importante de la industria de un país en vías de desarrollo de más de cien millones de habitantes, posee una problemática de equilibrio químico en el medio (particularmente, aunque no únicamente, la atmósfera) con poco o ningún precedente ([www.sma.df.gob.mx](http://www.sma.df.gob.mx)).

Entre los contaminantes químicos de la atmósfera preponderantes se encuentran los resultantes directos e indirectos de los procesos de combustión - vehículos automotores, generación termoeléctrica, industria en general- como: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ), dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ) y otros (Bravo, 1991). De muy particular importancia resultan sustancias como los hidrocarburos aromáticos, contenidos en la mezcla conocida como gasolina (importantísima como combustible, por lo tanto "materia prima" de muchos de los contaminantes citados), los cuales, especialmente

el benceno, han sido reconocidos por sus efectos a largo plazo, como la producción de leucemias (Melham, 1991).

## 2.- GASOLINA

La gasolina es desde hace tiempo objeto de estudio a nivel de eventos carcinogénicos, basados principalmente en su importante proporción de benceno. La gasolina es usada a escala mundial como combustible y disolvente industrial. Contiene (en porcentajes de peso) cerca del 53% de parafinas, 36% de hidrocarburos aromáticos, 6% de olefinas, 5% naftalenos y un 1% de otras sustancias, como el acetato de plomo (alrededor de 0.013 g/dl, en gasolinas *sin* plomo), empleado comúnmente y en conjunto, sustituyendo y/o sustituido por el benceno como antidetonante. El benceno en la gasolina se encuentra entre 0% y 7%, siendo típicamente entre 2% y 3% volumen. Otro antidetonante utilizado comúnmente en la gasolina es el metil-terbutil-éter, en concentraciones de hasta 15 % volumen. Entre otras, la gasolina contiene cantidades apreciables de tolueno y xilenos ([www.energia.gob.mx](http://www.energia.gob.mx)).

De acuerdo con reportes oficiales las gasolinas mexicanas premium<sup>mr</sup> y magna-sin<sup>mr</sup>, contienen alrededor de un 2% de benceno, incluso menor al reportado en las gasolinas estadounidenses y europeas (Petróleos Mexicanos, 1996). La problemática trasciende los porcentajes mencionados, dada la existencia de una importante cantidad de personas dedicadas a la venta comercial del combustible, quienes no poseen implementos de seguridad especiales que reduzcan su exposición o la de sus clientes; mientras que la existencia de gasolineras de

autoservicio con dispositivos especiales para la reducción del líquido volatilizado, en otros lugares del mundo es un evento por demás común (Egeghy *et al.*, 2000).

La gasolina es un líquido, mezcla en una alta proporción de hidrocarburos de cadenas de entre 8 y 10 carbonos, con una parte importante, altamente volátil, de otros compuestos orgánicos como el benceno (alrededor del 2%). La gasolina es resultado de un proceso de destilación fraccionada del petróleo crudo, conocido como "cracking", del cual se obtienen diversos subproductos ([www.energia.gob.mx](http://www.energia.gob.mx)).

La gasolina es principalmente tóxica para el sistema nervioso central, siendo los síntomas de una intoxicación aguda similares a aquellos causados por el etanol. La forma más rápida de absorción de la gasolina es a través del tracto respiratorio, e incluso es posible habituarse a su inhalación. La vía de exposición a la gasolina es tradicionalmente respiratoria, dada su pobre absorción cutánea, aun cuando su contacto accidental con las manos suceda durante su venta. Esto además se debe a la alta volatilidad de la fracción aromática del combustible (Raabe, 1993; Istituto Superiore di Sanità, 1997)

### Genotoxicidad

La genotoxicidad de la gasolina, y aún más su relación con el desarrollo de cánceres es un asunto pendiente y discutido en una importante cantidad de estudios (Richardson *et al.*, 1986; Loury *et al.*, 1987; Hadgany y Seemayer, 1988; Raabe, 1993; Reese y Kimbrough, 1994; Pitarque *et al.*, 1997; Carere *et al.*, 1998; Romieu *et al.*, 1999; Egeghy *et al.*, 2000, Yuan *et al.*, 2002; Heuser *et al.*, 2002). Loury *et al.* (1986) reportaron una negativa inducción de síntesis de ADN no programada en

células de riñón de rata expuestas *in vitro* o *in vivo* a gasolina sin plomo; sin embargo, Heuser *et al.* (2002) encontraron en una población de roedores (*Ctenomys minutus*) expuesta circunstancialmente a emisiones vehiculares un incrementado daño en ADN utilizando el Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), particularmente entre las hembras; Yuan *et al.* (2002) por su lado, hallaron en células CHL de criceto chino tratadas con gasolina con y sin plomo, mayor daño en ADN, aumento en colonias revertantes para histidina en la prueba de Ames y una frecuencia mayor de micronúcleos. Richardson *et al.* (1986) reportaron que la gasolina sin plomo no logró inducir mutaciones en el locus de la timidina-cinasa, así como tampoco intercambio de cromátidas hermanas en linfoblastos humanos *in vitro*. Hadgany y Seemayer (1988) obtienen una fuerte reducción dosis-dependiente de la viabilidad de células V79 expuestas a extractos de partículas de motores a gasolina, además de un incremento en mitosis aberrantes y otros problemas parecidos a aquellos causados por la colcemida, esto es, sugerentes de afectación del huso mitótico. Carere *et al.* (1998), por otro lado, encuentran una pequeña tendencia al desarrollo de lesiones cromosómicas en una población de gasolineros por encima de la presente en su grupo testigo; sin embargo, están condicionados a poblaciones ocupacionalmente expuestas.

#### Carcinogenicidad.

De acuerdo con la IARC, la gasolina está catalogada como “posible carcinógeno para humanos” ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)). Los resultados a nivel de desarrollo de cáncer han sido positivos en varios casos. Raabe (1993) por ejemplo, informa que en algunos seguimientos a poblaciones ocupacionalmente expuestas, existe cierto riesgo de desarrollo de cáncer de riñón y leucemias, así como altos índices de

incidencia de neoplasias hepáticas y tumores renales en ratas expuestas a distintas dosis de gasolina. Por otro lado, existen seguimientos particulares a través de los cuales se ha logrado asociar una vida de trabajo en una refinería de gasolina con el desarrollo de carcinomas renales o hepáticos, aún cuando el benceno es preferentemente promotor de leucemias (Raabe, 1993).

## A.- BENCENO

El benceno, benzol o ciclohexatrieno,  $C_6H_6$ , es en condiciones normales un líquido incoloro, menos denso que el agua, no polar y soluble en etanol, acetona, etc. Es altamente volátil, siendo su punto de evaporación a presión normal de  $80.1^\circ C$ . Posee un olor característico, de donde obtienen él mismo y sus derivados el apelativo de aromáticos. Dada su estructura en forma de anillo y la presencia pareada de dobles ligaduras en la molécula, el benceno tiene resonancia, siendo particularmente estable, con un peso molecular de 78.11 g/mol. Entre sus diversos derivados (hidrocarburos aromáticos) se encuentran el tolueno, el fenol, los xilenos, el xilol, los nitrobencenos, etc., la mayoría también líquidos y tóxicos *per se*, muchos presentes además en la gasolina (The Merck Index, 2001). El benceno y sus derivados son usados comúnmente como materia prima, disolventes y componentes de muchos productos de consumo. Una serie particular de derivados del benceno está constituida por compuestos como el naftaleno, antraceno y el fenantreno, compuestos de más de un anillo bencénico, normalmente tóxicos (The Merck Index, 2001).

Dentro de los muchos tipos de compuestos encontrados en la gasolina, el benceno y sus derivados son definitivamente los más tóxicos. Además de

encontrarse naturalmente en ésta, se agregan cantidades de los mismos como antidetonantes, sobre todo en aquellas *sin plomo*.

### Toxicidad

La intoxicación aguda por hidrocarburos aromáticos en humanos presenta los mismos efectos, independientemente de la vía de exposición. Es a su vez prácticamente la misma para el benceno, tolueno y xileno, donde el sistema nervioso central es el blanco principal. Estos compuestos sólo son moderadamente tóxicos en dosis agudas, recordando sus efectos a aquellos producidos por la intoxicación por etanol; los compuestos aromáticos en general son irritantes de la piel y las mucosas (Reese y Kimbrough, 1994).

El benceno es reconocido por sus efectos a largo plazo para los humanos: toxicidad hematopoyética, anemia, leucopenia, trombocitopenia, leucemia y en últimas instancias, la muerte (Reese y Kimbrough, 1994).

### Metabolismo

Se metaboliza principalmente en microsomas hepáticos, donde es transformado por oxidasas de función diversa en fenol, di y trihidroxibenzenos, cresol, y ácidos mercaptúrico y mucónico, siendo posible también la producción de quinonas y semiquinonas (Reese y Kimbrough, 1994).

El benceno parece estimular su propio metabolismo, sin embargo, el fenol y el tolueno lo inhiben. El etanol es a su vez un promotor del metabolismo del benceno,



junto con factores en la dieta como la restricción de carbohidratos (Reese y Kimbrough, 1994).

### Genotoxicidad

Se han publicado resultados positivos sobre genotoxicidad en células de ratón y de humanos ocupacionalmente expuestos. Smith *et al.* (1998) encontraron una alta incidencia de aberraciones cromosómicas en trabajadores expuestos; y por otro lado, tanto Plappert *et al.* (1994) como Tuo *et al.* (1996) mostraron evidencia de daño genotóxico por benceno en sangre periférica humana, hígado de ratón BDF-1 y sangre entera y médula ósea de ratón NMR1, además de datos negativos en médula ósea y bazo de ratones BDF-1, todo empleando la técnica del SCGE. Por su parte, Provost *et al.* (1996) obtuvieron incrementadas frecuencias de mutación en el gen *lacI* de un fago lambda, en bazo y médula ósea de ratones B6C3F transgénicos; en contraste, Surrallés *et al.* (1997) no hallan indicios de aumento en la frecuencia de micronúcleos por la exposición a benceno en células de epitelio bucal de trabajadores expuestos en Estonia.

Al respecto, Tsutsui *et al.* (1997) reportaron que al probar tanto el benceno como catecol, hidroquinona y fenol en células embrionarias de criceto sirio:

- a) Los cuatro compuestos resultaron inductores de transformación morfológica, siendo el más potente el catecol.
- b) Los cuatro compuestos produjeron mutaciones en dos loci (*hprt* y  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa) diferentes, induciendo resistencia a 6-tioguanina y a ouabaína, respectivamente.
- c) Aberraciones cromosómicas fueron inducidas por catecol e hidroquinona.

- d) Intercambios de cromátidas hermanas fueron promovidos por catecol, hidroquinona y fenol.
- e) Aneuploidía fue provocada por benceno y catecol.
- f) Todos los compuestos a excepción del benceno causaron síntesis no programada de ADN.

Se han propuesto ciertos mecanismos metabólicos para explicar tanto la forma en que interactúan sus diversos metabolitos, como la manera en que cierto tipo de daño se vuelve tejido-específico (Medinsky *et al.*, 1995). El benceno parece no afectar los sistemas de reparación de daño inducido, de acuerdo con Hallberg *et al.* (1995). A pesar de su importancia como disolvente a nivel industrial, la principal problemática a nivel epidemiológico es su presencia en el combustible comercial, lo que sugiere la importancia de estudiar la gasolina como agente genotóxico *per se* (Istituto Superiore di Sanità, 1997).

### Carcinogenicidad

La International Agency for Research on Cancer (IARC) considera al benceno como "carcinógeno para humanos", dentro de lo que definen como el grupo 1 ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)). Diversos estudios epidemiológicos han añadido importante evidencia de que esta sustancia representa un riesgo potencial para el desarrollo de leucemia, cáncer de tejido linfático, cánceres de cerebro, hígado, y de otros tejidos y órganos (Melham, 1991). La mayoría de sus metabolitos (ácido mucónico, hidroquinona, tolueno, benzotriol, etc.) han sido a su vez ensayados en búsqueda de eventos que pudiesen tener que ver con el desencadenamiento de una leucemia (Anderson *et al.*, 1995). Golding y Watson (1999) consideran posible que los metabolitos del benceno

(epóxidos, quinonas, aldehídos y oxepinas) sean los responsables directos de los eventos moleculares que desencadenan la carcinogénesis, además del incierto papel que tiene la formación de aductos de estos y otros metabolitos con ADN. Asimismo, reacciones del mismo benceno con enzimas como la topoisomerasa II podrían estar implicadas (Golding y Watson, 1999).

### Metabolitos del benceno

Existen además algunos estudios en que otros metabolitos del benceno han sido probados. Stark y Rastetter (1996) ensayaron una serie de derivados de los tautómeros óxido y oxepina de benceno. Entre los resultados que encontraron destacan que, comparados con los resultados negativos del benceno en una prueba de Ames para reversión prototrófica de histidina o adquisición de resistencia a 8-azaguanina, tanto el óxido como la oxepina causaron mutaciones puntuales.

El óxido 4,5-sim-oxepina, el 1,6-3,4-dióxido de 3,6-diazociclohexano y el transoide4,11-dioxiantricioundeca1,6-dieno resultaron tóxicos, mas no mutagénicos. Por otro lado, el sin-indan-3a,7a-óxido, y el sin-2-hidroxindan-3a-7a-óxido indujeron mutaciones puntuales. Por último, cabe mencionar que todos estos compuestos fueron citotóxicos para la *Salmonella* (Stark y Rastetter, 1996).

Asimismo, Ho y Witz (1997) encontraron que el trans,trans-muconaldehído, un derivado hematotóxico del benceno de procedencia microsómica, incrementó la actividad de los factores de transcripción AP-1 y NK-κB, ambos dependientes del estado de oxidación intracelular, en un sistema de células HL-60. Además,

observaron mayores niveles de ARNm de los genes *c-jun* y *c-fos*, los cuales pueden jugar un papel importante en el desarrollo de una leucemia (Ho y Witz, 1997).

## B.- TOLUENO

De fórmula  $C_7H_8$  y peso molecular de 92.14 g/mol (The Merck Index, 2001), el tolueno -que está presente en la gasolina- además de mostrar efectos tóxicos similares a los del benceno, produce anorexia y tiempo prolongado de reacción (delayed reaction time). En concentraciones altas, se ha reportado que el tolueno produce púrpura, paraestesia, distorsión visual, acidosis metabólica, coma –seguida de edema pulmonar- y disturbios nerviosos post-narcóticos. Se ha observado también que el tolueno provoca adicción, siendo generalmente inhalado por la población a partir de pegamentos, adelgazadores de pintura, líquidos limpiadores y quitaesmalte de uñas. Se han reportado casos en que individuos han adquirido tolerancia al compuesto. En estos casos, dosis superiores a la  $LD_{50}$  (10-28 mg/dl) producen solamente síntomas menores de intoxicación (Reese y Kimbrough, 1994).

### Metabolismo

El tolueno se acumula principalmente en tejidos ricos en lípidos y vasos sanguíneos, como cerebro, hígado, riñones y sangre. En el hígado es metabolizado hacia benzil-alcohol, y posteriormente, benzaldehído. Eventualmente, el tolueno es metabolizado en ácido hipúrico y ortocresol, principalmente encontrados en la orina. Parte importante del tolueno es en principio exhalado. Su metabolismo parece ser sexo-dependiente, siendo más acentuado en hembras de rata (Reese y Kimbrough, 1994).

## Genotoxicidad

Zarani *et al.* (1999) han encontrado que, a concentraciones de 0.1 a 5 mM, ni el tolueno ni su combinación con acetona y/o benceno provocan incremento en la aparición de micronúcleos en células binucleadas tras una exposición de 48 horas *in vitro*, en sangre humana entera. Resultados negativos sobre su genotoxicidad en poblaciones ocupacionalmente expuestas (trabajadores del calzado) han sido reportados (Pitarque *et al.*, 1999). Bogadi-Sare *et al.* (1997) encontraron en una población también expuesta en la industria del calzado que, si bien existe una diferencia en la aparición de aberraciones cromosómicas, éstas no tienen una correlación con los niveles de benceno o tolueno; más aún, la correlación encontrada se dio con factores de confusión como la edad y el consumo de alcohol. Por otro lado, Pelclova *et al.* (2000) encontraron una mayor incidencia de aberraciones cromosómicas en pintores expuestos comparados con una población no expuesta.

## Carcinogenicidad

La IARC concede al tolueno la categoría de grupo 3: "no clasificable por su carcinogenicidad para humanos", siendo las evidencias aún inadecuadas ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)). En un estudio con ratas y ratones con exposición durante 2 años, por parte del National Toxicology Program, si bien se encontraron diversos casos "raros" de tumores dentro de la población estudiada, éstos no tuvieron relación los unos con los otros y fueron muy pocos (National Toxicology Program, 1990). Por otro lado, en un estudio con humanos que han desarrollado cáncer hepático, Porru *et al.* (2001) encontraron que si bien estar expuesto a tolueno o xileno no es determinante en la

emergencia de la neoplasia, el estar en contacto constantemente a estos disolventes podría ser un factor de riesgo para tal enfermedad.

## C.-XILENO

Fórmula  $C_8H_{10}$  y peso molecular de 106.17 g/mol (The Merck Index, 2001), existen tres diferentes isómeros del xileno: orto, meta y para, siendo comunes las mezclas de los tres. Los tres se encuentran en la gasolina, y parecieran ser igualmente tóxicos de acuerdo con datos encontrados en humanos y animales. La exposición aguda a xileno produce irritación en nariz y garganta, congestión pulmonar severa, hemorragia pulmonar y edema. Ingerido, provoca irritación en la mucosa gástrica. El contacto epitelial provoca sensaciones de quemado, eritema e incluso dermatitis. Sin embargo, los efectos a nivel neurológico son los más interesantes y menos comprendidos, que van desde una alteración en la memoria a corto plazo y el equilibrio, hasta hemorragia cerebral, episodios epilépticos, inconsciencia y amnesia. La muerte puede ser una última consecuencia, dada una sensibilización del miocardio a la epinefrina. Por si fuera poco, efectos en el sentido de la vista son comunes. Una alteración de la conductividad nerviosa ha sido sugerida como el medio para la aparición de estos trastornos. Asimismo, se ha sugerido que la susceptibilidad a los efectos tóxicos del xileno es mayor para el sexo femenino (Reese y Kimbrough, 1994).

### Metabolismo

El xileno es rápidamente absorbido por estómago y pulmones. Su metabolismo es independiente de la vía de exposición, el isómero específico, la dosis

administrada o la duración de la misma. Una gran proporción de los metabolitos del xileno, principalmente ácidos metilhipúricos, son excretados con la orina dentro de 18 horas después de la exposición, siendo ya detectables después de 2 horas de la misma (Reese y Kimbrough, 1994).

### Genotoxicidad

Se ha reportado que una mezcla de los tres isómeros del xileno es incapaz de inducir el profago lambda en un ensayo de *Escherichia coli* WP2s Microscreen (DeMarini *et al.*, 1999), sin embargo, el o-xileno podría ayudar a la formación de aductos de benzo(a)pireno con el ADN (Park y Shatz, 1999), mediante la modificación de la actividad de la oxidasa multifunción, además de reducir la actividad de otras enzimas responsables de la degradación del benzo(a)-pireno hacia metabolitos no tóxicos.

### Carcinogenicidad

Los xilenos, como se había indicado antes, representan un riesgo para el desarrollo de carcinomas hepáticos, aun cuando los resultados encontrados por Porru *et al.* (2001) no son concluyentes, por lo que la IARC lo califica como “no clasificable por su carcinogenicidad para humanos” (grupo 3), dadas las inadecuadas evidencias al respecto tanto en sistemas animales como en humanos ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)).

## D.-METIL-TERBUTILÉTER

El Metil-terbutiléter, de fórmula  $\text{CH}_3-(\text{C}_3\text{H}_7)-\text{O}-\text{CH}_3$ , es un compuesto recurrente en las gasolinas "oxigenadas", en sustitución de otros antidetonantes basados en plomo, y en concentraciones de hasta 15% volumen en las gasolinas estadounidenses. Los síntomas de una intoxicación aguda son: dolor de cabeza, irritación ocular, quemaduras en nariz y garganta, náuseas, mareos y tos (Ahmed, 2001).

### Genotoxicidad

Si bien se ha descubierto que puede tener alguna injerencia en la reparación de ADN, este compuesto parece ser relativamente inocuo para personas no expuestas ocupacionalmente (Ahmed, 2001).

### Carcinogenicidad

A pesar de que tiene una probada capacidad carcinogénica en animales, su potencial riesgo para los humanos no ha sido esclarecido (Ahmed, 2001).

## 3.- GENOTOXICIDAD Y CARCINOGENESIS

Los conceptos genotoxicidad y carcinogénesis están íntimamente ligados. A pesar de que la carcinogénesis no es intrínsecamente dependiente de un daño a nivel genético es necesariamente, aunque no exclusivamente, la integral proyectada en el tiempo de una serie de desórdenes (mutaciones de todos los tipos) en el ADN. El



desarrollo de un cáncer implica una desregulación de los sistemas que controlan el ciclo celular, derivando en una división celular anormalmente mayor, y donde las células eventualmente adquieren otras características como las de desdiferenciación y la capacidad de formar vasos sanguíneos y migrar a diversos tejidos del organismo. Mutaciones puntuales en ciertos genes controladores del ciclo celular, amplificación o delección de algunos otros, traslocación y formación de proteínas quiméricas con funciones enrarecidas en otros casos, son algunos de los muchos caminos que siguen las células en vías de la transformación maligna (Lewin, 1994). Este tipo de eventos no solamente da lugar a estas dolencias. La presencia de los mismos en células germinales puede expresarse de maneras detrimentes en subsecuentes generaciones.

El desarrollo de un cáncer ocupa un tiempo, si bien no definido, por lo menos intrínsecamente largo, dada la indispensable acumulación de accidentes moleculares y celulares para que éste se dé. De ahí se genera la necesidad de poder evaluar la producción de estos accidentes, aún de manera inespecífica, como una forma de valoración de riesgo al desarrollo de estas dolencias debido a agentes xenobióticos, presentes en el ambiente y resultado mismo de la actividad humana.

Diversas pruebas que valoran el daño al ADN han sido desarrolladas e implementadas a lo largo de los últimos años. Los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH), las pruebas de Aberraciones Cromosómicas, prueba de Ames, el ensayo Cometa y muchas otras han sido desarrolladas con el objetivo de encontrar daño en el ADN a partir de diversas premisas y con diferentes grados de especificidad y precisión. El desarrollo de estas pruebas responde a la necesidad de encontrar diversos biomarcadores de efecto, los cuales deben de una forma precisa

y eficiente, dilucidar el riesgo real de un organismo tras una exposición riesgosa, esto es, la magnitud y el nivel de daño que una exposición de esta naturaleza ha provocado en el organismo indicado (Brusick, 1987). Asimismo, y debido a la necesaria proyección temporal de este daño para la aparición de una lesión carcinogénica, la temprana determinación de tal alteración es por demás importante, dando como resultado la necesaria búsqueda de marcadores de efecto temprano. Uno de ellos, propuesto en la última década, ha sido el daño detectado por el ensayo de electroforesis unicelular, SCGE, o ensayo "Cometa" (Singh *et al.*, 1988).

#### 4.- ENSAYO COMETA

La técnica de electroforesis unicelular (SCGE por sus siglas en Inglés "Single Cell Gel Electrophoresis"), o ensayo "Cometa", es una sencilla, confiable, rápida y eficiente forma de detección de daño en el ADN de células individuales (Rojas *et al.*, 1999). Diferentes variaciones a la técnica permiten a su vez la detección de un tipo de daño específico en el ADN, a diferentes niveles: rompimientos de doble cadena, cadena sencilla y/o de sitios álcali-lábiles o de reparación tardía; dependiendo básicamente de las condiciones de pH bajo las cuales se lleva a cabo el ensayo. Prácticamente cualquier tipo celular es susceptible de análisis con esta técnica, siendo además muy pequeño el número de células necesarias para la cabal implementación de la misma. La técnica permite a su vez la obtención de una gran cantidad de datos, dado el número de células que se pueden observar en una sencilla lámina de microscopio (Singh *et al.*, 1988). En el análisis tradicional de las células estudiadas, el valor de referencia habitual es la longitud de la "cola", formada por la migración en el campo electroforético de los pequeños fragmentos de ADN rotos -que construyen junto con el ADN que se conserva íntegro- una estructura que

semeja precisamente un Cometa (figura 1)-. Sin embargo, con la ayuda de los ordenadores y la digitalización de las imágenes provenientes del microscopio, actualmente se tiene la capacidad de analizar una variedad amplia de parámetros, entre los que se incluyen porcentajes de ADN en "cabeza" y "cola" del Cometa, tamaño de ambos, y el también ampliamente citado "momento de cola", producto de la longitud de la cola por el porcentaje de ADN en la misma (Olive *et al.*, 1999).

Diversos estudios indican la posibilidad de que una célula sana, que ha sufrido cierto nivel de daño genotóxico no letal, será capaz de reparar el 50% del mismo en alrededor de 15 minutos, y de repararlo completamente en el transcurso de entre 60 y 120 minutos (Tice y Strauss, 1995; Rojas *et al.*, 1999). A partir de esta premisa, se establece un protocolo experimental para el ensayo Cometa, con el objeto de evaluar el estado de los diversos sistemas de reparación de daño al ADN.

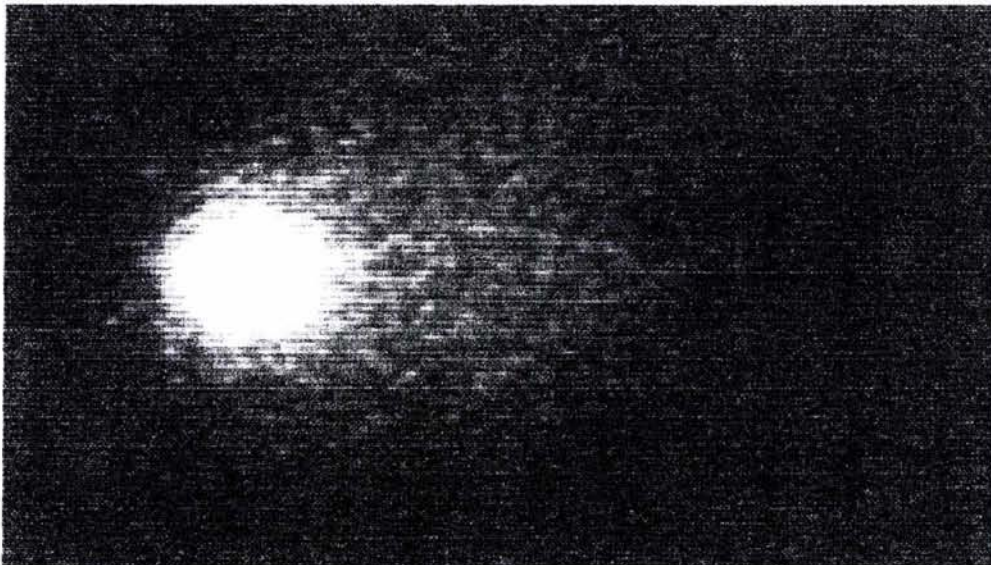


Figura 1.- Cometa, tal como se ve al microscopio o a través del digitalizador (20X).

El protocolo se basa en la inducción incidental de daño en el ADN con una cantidad controlada de un agente químico probadamente capaz de inducir tal daño, como el peróxido de hidrógeno. Dicho daño se registra, y a continuación se permite que las células dañadas reparen el daño, reposando en medio de cultivo libre del compuesto químico inductor.

Dos registros más del daño se hacen en el lapso de una hora, donde se compara la cantidad de éste que fue reparada, o en su defecto, su extensión. El protocolo ha sido probado en sistemas como las células de enfermos de ataxia telangectasia, caracterizadas por su pobre reparación (Duker, 2002) con resultados óptimos. A partir de los datos presentados de la capacidad de los diversos compuestos presentes en la gasolina como causas eficientes de problemas sanitarios, más la caracterización del benceno como promotor de leucemia, consideramos importante indagar respecto al posible efecto que una exposición ligera pero crónica pudiese tener sobre la integridad del ADN (daño basal) y la capacidad de reparación de un daño provocado sobre el mismo.

## OBJETIVOS

- **Objetivo general:**
  - *Evaluar el daño presente en el ADN y la capacidad de reparación del mismo en personas ocupacionalmente expuestas a vapores de gasolina, en células de sangre periférica.*
  
- **Objetivos particulares:**
  - *Determinar el grado de exposición a VOCs y plomo, daño basal y cinética de reparación de daño inducido de los diversos grupos muestreados.*
  - *Asociar una posible diferencia en el daño basal de los diferentes grupos con el grado de exposición ocupacional correspondiente.*
  - *Discriminar las diferencias de cinética de reparación entre tres poblaciones con distintos grados de exposición a vapores de gasolina (gasolineros, trabajadores de la vía pública, oficinistas).*
  - *Determinar la existencia de correlaciones entre los niveles de reparación observados y las diversas variables obtenidas de cuestionarios personales sobre exposiciones previas, hábitos riesgosos, etcétera.*

## **Metodología**

- Muestreo

Sangre periférica de 27 gasolineros, 10 oficinistas y 8 trabajadores de la vía pública fue recolectada por punción venosa en tubos vacutainer. Un consentimiento firmado de parte de los donadores, en el cual se detalla el destino de las muestras fue requerido. Los tubos con la sangre destinada a la determinación de VOCs contenían una mezcla de oxalato de potasio y fluoruro de sodio, mientras aquellos para la determinación de plomo y el SCGE estaban heparinizados.

Un cuestionario (a partir del cual se construyó una base de datos) sobre estilo de vida, edad, tiempo de trabajo, exposiciones riesgosas y otros eventos fue aplicado a todos los participantes. Éste se encuentra desglosado en la figura 2. Más detalles sobre las diferencias en cuanto a niveles de benceno en sangre y otros aspectos acerca de los individuos participantes se encuentran en Romieu *et al.* (1999).

- Determinación de VOCs

Una parte de la muestra de sangre fue utilizada para la medición de concentraciones de benceno, tolueno, orto, meta y para xileno por cromatografía de gases de purga y trampa, utilizando espectrometría de masas de dilución de isótopos.

Brevemente, las muestras fueron calentadas a 30° C, purgadas con helio por 15 min y después atrapadas en Tenax. El agua absorbida fue removida de las trampas de Tenax por purgación seca con helio durante 6 minutos. Las trampas fueron desasorbadas térmicamente a 180° C por 4 minutos y los compuestos orgánicos volátiles (benceno, tolueno y orto, meta, para – xilenos) fueron criogénicamente atrapados en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Las muestras fueron inyectadas en la columna calentando las trampas criogénicas. La separación en la columna capilar DB-624 fue seguida por una detección de espectrometría de masas de alta resolución. La cuantificación fue realizada comparando las respuestas iónicas específicas de las muestras contra una curva estándar de seis puntos.

Durante aproximadamente 6 horas, los gasolineros utilizaron monitores personales (passive organic vapor badges) por medio de los cuales la concentración de benceno en el ambiente fue medida.

Los monitores fueron sellados con tiras de carbón activado después de las 6 horas y mantenidos a 4° C hasta el momento de su análisis. Posteriormente, el sello fue removido y colocado en un vial séptico de 2 ml con 1 ml de disulfuro de carbono purificado. Después de una ultrasonicación de aproximados 30 minutos, una alícuota del extracto fue inyectada en el cromatógrafo de gases. En una precolumna de 1,2,3-tris(cianoetoxi)propano al 10% se preseparó el disolvente de los compuestos aromáticos. Esta fue conservada a -180° C con nitrógeno líquido, y después calentada eléctricamente a destellos para la inyección de los compuestos en la columna para su identificación por detección de ionización inflamable. Por último, cabe mencionar que las medidas de benceno obtenidas para las muestras se

encontraron dentro de los límites de la curva de calibración. El anterior procedimiento se realizó de acuerdo con el reportado por Ashley *et al.* (1992).

- Determinación de plomo

De una muestra de tres mililitros de sangre entera obtenida por punción venosa en tubos heparinizados, una alícuota de 0.5 ml se transfirió hacia un vial de digestión de teflón, donde se evaporó y digirió durante 8 horas en 5 ml de HNO<sub>3</sub> 16 N caliente. Después, la muestra fue totalmente secada y redisuelta en HNO<sub>3</sub> 1 N. La concentración de plomo fue medida en un espectrómetro de masas de alta resolución de plasma acoplado inductivamente de Finnegan Element<sup>™</sup>; en modo de cuenta de multi- isótopos, con calibración interna y externa. Este método tiene una precisión de menos de 0.5% de desviación estándar relativa para concentraciones mayores a 0.05 partes por mil millones, con un límite de detección de 0.01 partes por mil millones; y fue realizado de acuerdo con Woolard *et al.* (1997).

Estas mediciones se encuentran anexadas al cuestionario sobre estilos de vida y exposiciones riesgosas en la figura 2 (sombreados).

- Testigo histórico

Toda vez que los resultados para los diversos grupos no presentaron diferencias entre sí (ver resultados), se decidió compararles contra un grupo testigo histórico del laboratorio, formado por 22 sujetos sanos, no fumadores de entre 19 y 40 años de edad, estudiantes e investigadores del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.



Fecha	¿Exposición a radiación?	¿Cae gasolina en sus manos?
Participación	¿Exposición a quimioterapia?	¿Sirve además aceite?
Edad	¿Exposición a medicamentos?	¿Detecta olor a mofle?
Gasolinera (nombre)	Tráfico en el trayecto a casa	Concentración de plomo en sangre
Años en el puesto	Transporte a casa	Tipo de monitor
Turno de trabajo	Tiempo de transporte a casa	Fecha de toma de muestras
Hora de inicio	¿Fuma actualmente?	Hora de inicio del muestreo
Hora de término	Promedio de cigarrillos al día	Hora de término del muestreo
¿Exposición a tabaco?	¿Otro fuma en casa?	Tiempo efectivo de monitoreo
¿Exposición a alcohol?	¿Fuma otro en el trabajo?	Concentración de benceno en mg/m <sup>3</sup>
¿Exposición a disolventes?	¿Fuma en el trabajo?	Concentración de meta, para-xileno
¿Exposición a pinturas vinílicas?	¿Ha tomado alcohol?	Concentración de orto-xileno
¿Exposición a pegamentos?	¿Toma medicamentos?	Microgramos de benceno
¿Exposición a fertilizantes?	¿Toma vitaminas?	Concentración de benceno en µg/m <sup>3</sup>
¿Exposición a benceno?	¿Cuántos vehículos sirve?	Concentración de benceno en ppb
¿Exposición a dicromocloropropano?	¿Detecta olor a gasolina?	¿Quién fuma en casa?
¿Exposición a vapor?	¿Come junto a las bombas?	¿Fumador pasivo?

Figura 2: Datos sobre concentraciones de diversas sustancias en sangre fueron agregados (sombreados).

- Ensayo de viabilidad

La viabilidad de las células sanguíneas de todos los participantes fue ensayada mediante la técnica de exclusión de azul tripano en 30 µl de sangre entera, siendo prácticamente del 100% para todos los individuos, tanto al tiempo cero, como después de los 50 min de reparación.

- Ensayo Cometa

De acuerdo con la técnica convencional, descrita gráficamente en la figura 3, y de acuerdo con la detallada en Rojas *et al.*, 1999; 10 $\mu$ l de sangre entera son mezclados en 75  $\mu$ l de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% a 37 °C y vaciados en portaobjetos, los cuales se han cubierto previamente con una capa de solución al 0.5% de agarosa regular, y que a su vez se ha deshidratado previamente a 40°-50°C. Se adicionan 75  $\mu$ l de la solución de sangre con agarosa aún líquida y se cubren las láminas con un cubreobjetos común. Las láminas así dispuestas son colocadas a 4°C, durante unos 5 minutos, para optimizar la solidificación. Una capa más de 75  $\mu$ l de solución de agarosa se agrega después, cubierta de la misma manera, dejándole a su vez solidificar antes de ponerse en Köplins con solución de lisis (30 ml NaCl 2.5 M, 5 ml EDTA 100 mM, tris-base pH 10 + 10% DMSO y 1% triton x-100 enfriada a 4°C), donde permanecen al menos 1 hora a la misma temperatura.

Posteriormente, las laminillas son acomodadas en una cámara de electroforesis horizontal en presencia de solución de electroforesis: 300 mM NaOH, 1 mM de Na<sub>2</sub>-EDTA, pH>13, -con lo cual se pretende específicamente detectar rompimientos de cadena sencilla, sitios álcali-lábiles y sitios de reparación retardada-. Las láminas se dejan 20 minutos en estas condiciones para permitir que se desenrolle el ADN. Después es realizada una electroforesis a 25 voltios, 300 miliamperes (0.8v/cm), de 20 minutos. Una última neutralización con tris 0.4 M a pH 7.5 durante unos 10 minutos se lleva a cabo antes de fijar las láminas en etanol absoluto por un minuto, y

después de secadas al aire, almacenarlas para ser propiamente teñidas y leídas en cualquier momento.

Con el objetivo de evaluar la cinética de reparación de daño inducido en las células de los individuos muestreados; a partir del ensayo Cometa, y dadas las características y ventajas mencionadas antes, el siguiente protocolo se implementó: Un volumen de 80  $\mu$ l de la sangre obtenida inicialmente se divide en cuatro partes iguales. A partir del primer tubo se realizan dos laminillas de Cometa de cada individuo, representantes del daño basal. Posteriormente, se inducen rompimientos de ADN en los tres tubos restantes mediante un tratamiento con 11.05  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 100 mM. Diez minutos después de la adición del peróxido, se realizan dos laminillas más por individuo con el fin de medir el daño inducido. Asimismo, los dos tubos restantes se centrifugan y las células se resuspenden en medio de cultivo RPMI-1640 limpio, en el cual se permite a las células reposar a temperatura ambiente durante 25 y 50 minutos, tiempos a los cuales dos pares más de laminillas de Cometa se hacen, con el objeto de ponderar el daño remanente después de este tiempo, y así, la cinética de reparación de estas células. Además, del cuarto tubo se retiran 30  $\mu$ l para el análisis de viabilidad.

- Evaluación de daño

Las laminillas resultantes del ensayo Cometa fueron teñidas con una solución de bromuro de etidio 0.2 mg/ml. Posteriormente fueron digitalizadas con una cámara CCD modelo KP-M1EK/K de Hitachi<sup>mf</sup> conectada a un microscopio BX60 de Olympus<sup>mf</sup> (filtro de 515 a 560 nm, 20X), para el posterior análisis de las imágenes

con el programa Komet 3.0 de Kinetic Imaging Ltd., específico para el ensayo Cometa. De los datos resultantes únicamente fue tomada la longitud de cola, dado que es el parámetro elegido históricamente, además de que el momento de cola presentó un comportamiento similar al de la longitud. Asimismo, al calcular los porcentajes de reparación, el utilizar el momento de cola pudiese ser artificioso, ya que en sí mismo es un porcentaje (porcentaje de la integral de la intensidad en la cola multiplicado por la longitud de la misma). Veinticinco células por cada laminilla, 2 laminillas por cada condición fueron registradas.

- Detección de daño Basal

Las diversas series de láminas correspondientes al tratamiento nulo fueron leídas. Este daño basal representa la cantidad de rompimientos de cadena sencilla presentes en el ADN de las células al momento del muestreo. Los resultados fueron analizados estadísticamente en búsqueda de diferencias entre los distintos grupos de exposición. Asimismo se les consideró posteriormente como el 0% de daño con respecto al daño inducido *in vitro* por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con el cual se les comparó buscando que éste fuese significativamente mayor al daño basal.

- Estandarización de los datos

Se obtuvieron medias aritméticas para cada una de las ocho laminillas analizadas con el ensayo Cometa (daño basal, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25 y 50 min de reparación, por duplicado). De éstas, la media del daño basal fue sustraída de las medias de las otras categorías.

$$\text{Daño Inducido} = \text{Daño H}_2\text{O}_2 - \text{Daño Basal}$$

$$\text{Daño Remanente 25 min} = \text{Daño 25 min} - \text{Daño Basal}$$

$$\text{Daño Remanente 50 min} = \text{Daño 50 min} - \text{Daño Basal}$$

El resultado de la resta del daño H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menos el daño basal fue considerado como el 100% del daño inducido. Posteriormente, por medios aritméticos, el daño remanente a 25 y 50 min fue transformado en porcentaje del 100% de daño inducido.

$$\% \text{ Daño Remanente 25 min} = \frac{\text{Daño Remanente 25 min}}{\text{Daño Inducido}} * 100$$

$$\% \text{ Daño Remanente 50 min} = \frac{\text{Daño Remanente 50 min}}{\text{Daño Inducido}} * 100$$

En última instancia, estos porcentajes de daño remanente se transformaron en porcentajes de reparación de acuerdo con la fórmula:

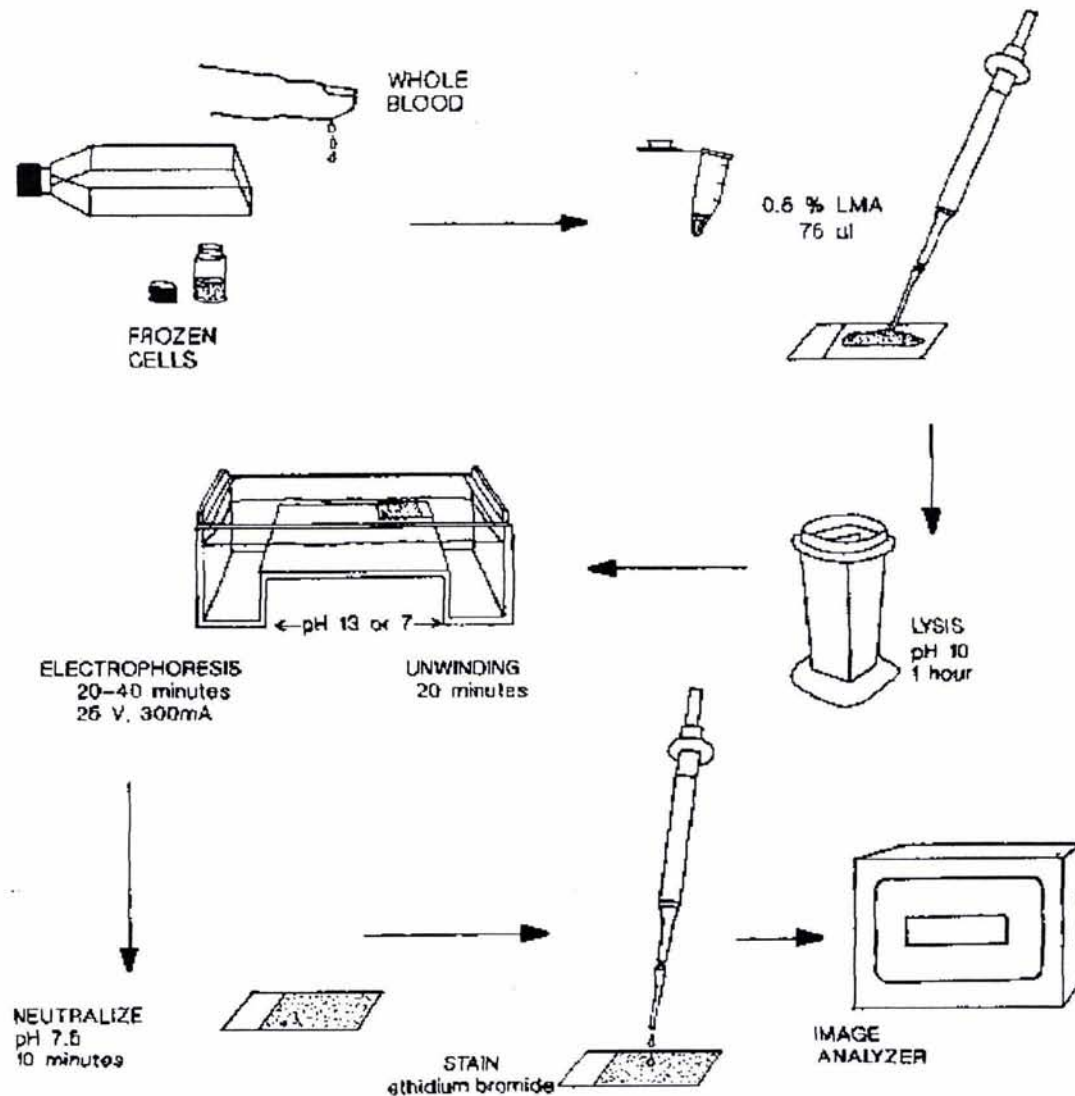
$$\% \text{ Reparación 25 min} = 100\% - \% \text{ Daño Remanente 25 min}$$

$$\% \text{ Reparación 50 min} = 100\% - \% \text{ Daño Remanente 50 min}$$

- Análisis estadístico

Se utilizaron las pruebas de t de Student y de U de Mann-Whitney para la determinación de una inducción de daño exitosa; análisis de varianza y pruebas de Tukey para comparar los promedios de porcentajes de daño reparado y buscar diferencias entre las diversas categorías de reparación registradas; Ji-cuadrada y Mc

Nemar's para la comparación de las proporciones de individuos con reparación positiva y negativa, y regresión lineal y múltiple para la determinación de posibles relaciones entre las distintas variables concentradas en la base de datos y el porcentaje de daño inducido reparado. Se emplearon los programas Excel, Stat, Sigma Plot y Statistica.



### EXPERIMENTAL PROTOCOL

Figura 3.- Protocolo experimental del ensayo Cometa (tomado de Rojas *et al.*, 1999).

## **RESULTADOS**

Los gasolineros, trabajadores todos de la misma estación de servicio, con un promedio de edad de  $29.33 \pm 8.54$  años, y de  $5.08 \pm 5.69$  años trabajando en el mismo puesto.

Los oficinistas, todos trabajadores de la misma empresa y en la misma planta física, tienen una edad promedio de  $38.7 \pm 13.58$  años, y llevan trabajando en el mismo lugar  $12.3 \pm 6.98$  años. La oficina está ubicada a unas cinco calles de la estación de servicio.

Los trabajadores de la vía pública son todos vendedores, en los alrededores de la estación de servicio y la oficina, ambas sitas en una zona de tráfico denso, en la Ciudad de México. El promedio de edad entre ellos es de  $28 \pm 7.61$  años, y el de trabajo es de  $8 \pm 7.85$  años.

Los sujetos del control histórico, todos sanos y no fumadores; pertenecientes a la comunidad del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM; con un promedio de edad de  $26.44 \pm 9.89$  años, con un rango de entre 1 y 15 años trabajando en dicho lugar.

Tabla 1: Resultados de la determinación de VOCs y plomo en sangre y aire.

<b>Promedios de exposición por grupo</b>			
<b>Compuesto</b>	<b>Gasolineros</b>	<b>Oficinistas</b>	<b>T.v.p.</b>
<b>Benceno</b>	<b>4.37 ± 1.93*</b>	<b>0.56 ± 0.19</b>	<b>0.81 ± 0.26</b>
<b>Orto xileno</b>	<b>1.83 ± 3.83</b>	<b>0.22 ± 0.05</b>	<b>0.34 ± 0.06</b>
<b>Meta, Para xileno</b>	<b>5.41 ± 11.91</b>	<b>0.59 ± 0.15</b>	<b>0.92 ± 0.13</b>
<b>Benceno en aire</b>	<b>0.37 ± 0.17*</b>	<b>0.14 ± 0.19</b>	<b>0.07 ± 0.02</b>
<b>Plomo</b>	<b>9.35 ± 3.32</b>	<b>12.81 ± 6.07</b>	<b>12.09 ± 3.81</b>

Benceno y xilenos:  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , determinados por cromatografía de gases de purga y trampa. Benceno en aire:  $\text{mg}/\text{m}^3$ , determinado por cromatografía de gases de purga y trampa. Plomo:  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , determinados por espectrofotometría de masas. \*  $p < 0.05$ , prueba de Tukey.

Es importante notar por un lado que el grupo de mayor exposición a vapor de gasolina está en realidad expuesto en mayor medida a benceno; por otro lado, resulta por demás interesante el hecho de que si bien no existe una diferencia significativa, los grupos de oficinistas y t.v.p. presentan concentraciones mayores de plomo en sangre, aun mayores a lo establecido como norma ( $10 \mu\text{g}/\text{dl}$ ).

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos de daño basal de las células de cada individuo, donde es posible apreciar que no existe una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, es notable el hecho de que los mayores promedios y dispersiones de valores de daño se dieron tanto entre gasolineros, como entre t.v.p.



Al no haberse encontrado diferencias entre los distintos grupos de exposición, se decidió compararlos contra un testigo histórico del laboratorio, el cual presentó daño basal significativamente menor al de dos de los tres grupos de exposición (gasolineros y t.v.p., ambos con valores de  $p < 0.05$ ); con lo que se puede decir que más allá de la falta de diferencia entre los grupos de exposición, todos tienen un daño basal mayor del normalmente esperado. Los datos de este grupo fueron incluidos en la figura 4.

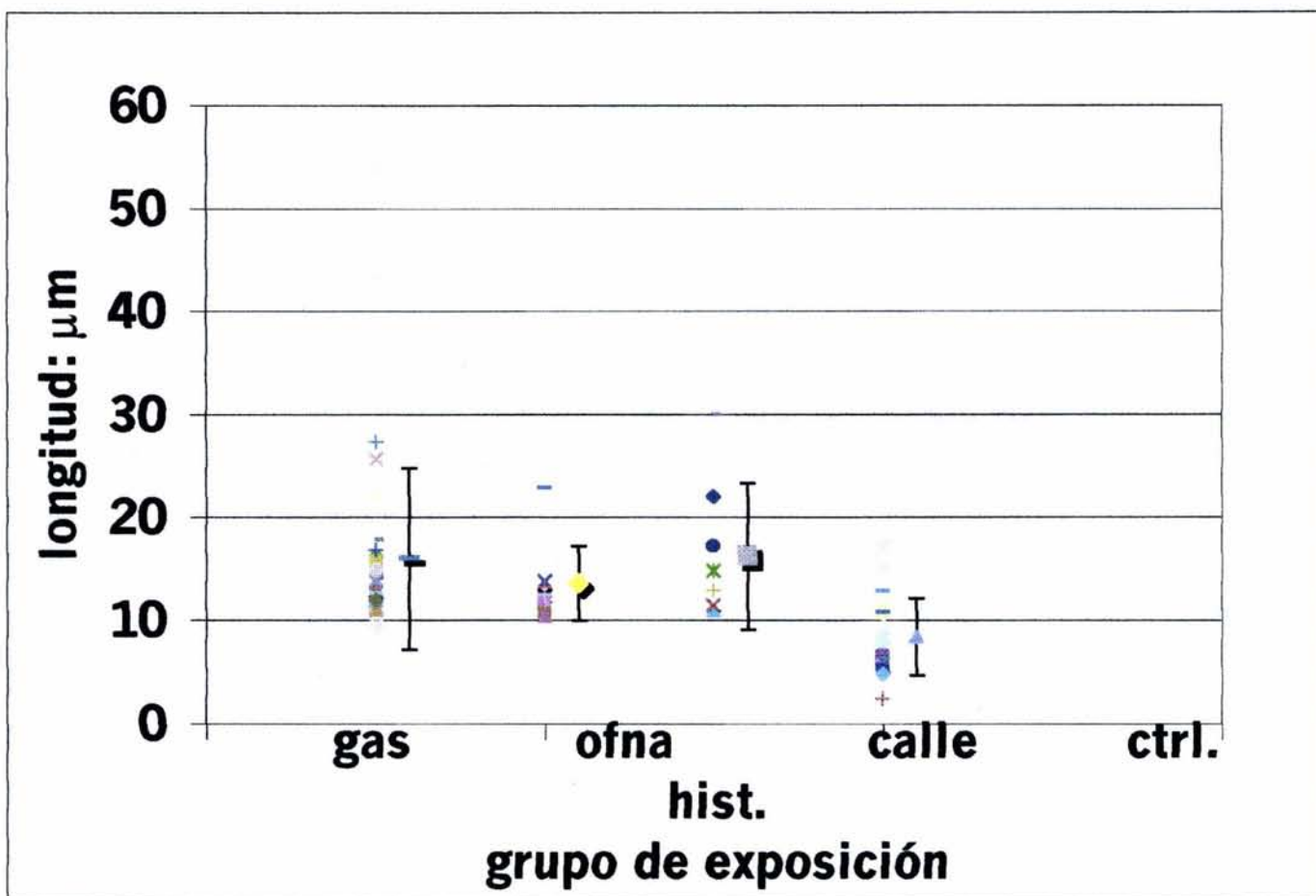


Figura 4: daño basal en términos de longitud de cola ( $\mu\text{m}$ ), determinado mediante SCGE. Del lado izquierdo se encuentran los datos individuales, como indicación de la dispersión grupal. Del lado derecho se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de cada grupo de exposición. Acotaciones:

gas : gasolineros

ofna : oficinistas

t.v.p. : trabajadores de la vía pública

ctrl. hist. : testigo histórico.

Una de las ventajas del SCGE, es la posible inducción de daño genotóxico en las células muestreadas mediante una exposición transitoria (10 min) a una solución de peróxido de hidrógeno 100 mM en medio de cultivo. En el presente estudio, lo anterior fue comprobado mediante la implementación de una prueba t de Student o U de Mann-Whitney, con la cual se compararon los promedios del daño basal con sus correspondientes promedios de daño inducido, siendo incluidos en las subsecuentes mediciones de daño remanente (reparación inferida) sólo aquellos cuyas diferencias resultaron significativas, obteniéndose valores de p menores o iguales a 0.01. Los resultados de esta inducción de daño se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Datos de Daño Basal, Daño H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Daño Remanente a 25 y 50 min y Porcentajes de Reparación a 25 y 50 minutos, en términos de longitud de cola (µm).

Gasolineros:

<i>Individuo</i>	Daño				Reparación	
	<i>Basal</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>25 min</i>	<i>50 min</i>	<i>% a 25 min</i>	<i>% a 50 min</i>
4	11.11	18.78	21.05	16.34	0	31.82
5	11.39	20.03	18.47	15.05	18.15	<b>57.66</b>
6	11.22	20.07	23.14	20.45	0	0
10	13.73	39.16	18.61	19.51	<b>80.82</b>	<b>77.26</b>
11	12.61	22.75	20.94	19.97	17.87	27.49
12	27.28	37.70	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
18	14.04	30.49	29.34	31.43	6.99	0
22	11.36	26.90	16.48	14.25	<b>67.04</b>	<b>81.39</b>
24	9.30	26.03	22.72	20.59	19.79	32.50
25	53.90	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
29	22.23	9.47	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
30	15.85	32.65	14.98	33.07	<b>105.19</b>	0
31	9.62	30.73	29.58	44.11	5.45	0
32	14.63	27.98	24.49	22.40	26.11	41.78
33	11.74	38.29	13.59	20.98	<b>93.04</b>	<b>65.22</b>
40	12.37	35.09	22.96	18.57	<b>53.37</b>	<b>72.70</b>
41	12.61	35.96	25.47	20.77	44.93	<b>65.07</b>
42	16.17	38.19	19.62	28.36	<b>84.34</b>	44.62
43	15.57	31.95	28.92	27.63	18.51	26.38
44	10.98	22.65	20.77	23.59	16.12	0
45	25.61	21.29	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
46	13.83	21.29	20.35	33.59	12.62	0
47	18.70	23.21	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
48	16.72	40.10	31.78	38.26	35.62	7.90
49	17.74	30.45	21.71	31.81	<b>68.77</b>	0
50	12.13	34.84	26.79	14.60	35.43	<b>89.11</b>
51	11.92	27.77	16.83	26.06	<b>69.01</b>	10.77
<i>Promedio</i>	15.94	28.61	22.21	24.61	37.04	21.46
<i>Desv. Est.</i>	± 8.77	± 7.78	± 4.93	± 8.05	± 37.28	± 56.23

Tabla 2 (cont.)

Oficinistas:

<i>Individuo</i>	Daño				Reparación	
	<i>Basal</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>25 min</i>	<i>50 min</i>	<i>% a 25 min</i>	<i>% a 50 min</i>
<b>2</b>	10.77	18.43	17.77	14.46	8.64	<b>51.82</b>
<b>8</b>	10.38	22.65	11.29	13.07	<b>92.61</b>	<b>78.13</b>
<b>9</b>	13.73	26.24	22.86	16.34	27.02	<b>79.11</b>
<b>13</b>	12.44	31.78	26.83	43.34	25.59	<i>0</i>
<b>14</b>	16.17	35.52	22.44	17.18	<b>67.60</b>	<b>94.78</b>
<b>15</b>	13.14	23.69	14.32	22.51	<b>88.78</b>	11.22
<b>19</b>	12.26	6.68	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>20</b>	22.80	18.85	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>26</b>	11.99	19.30	42.58	31.36	<i>0</i>	<i>0</i>
<b>34</b>	11.99	26.83	17.25	19.90	<b>64.55</b>	46.71
<i>Promedio</i>	13.57	23.00	21.92	22.27	7.09	4.97
<i>Desv. Est.</i>	± 3.62	± 8.01	± 9.72	± 10.28	± 134.93	± 89.65

T.V.P.:

<i>Individuo</i>	Daño				Reparación	
	<i>Basal</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>25 min</i>	<i>50 min</i>	<i>% a 25 min</i>	<i>% a 50 min</i>
<b>3</b>	21.98	20.58	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>7</b>	10.94	21.99	11.19	16.90	<b>97.74</b>	46.06
<b>16</b>	11.43	20.14	28.15	23.83	<i>0</i>	<i>0</i>
<b>17</b>	14.74	22.72	18.82	16.06	48.91	<b>83.41</b>
<b>21</b>	17.18	38.89	15.99	19.86	<b>105.46</b>	<b>87.64</b>
<b>27</b>	12.86	20.38	18.75	25.68	21.76	<i>0</i>
<b>28</b>	29.94	24.12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>Promedio</i>	17.01	24.12	<i>18.58</i>	<i>20.47</i>	36.37	20.87
<i>Desv. Est.</i>	± 6.86	± 6.67	± 6.19	± 4.21	± 79.67	± 73.03

Determinados mediante SCGE. Datos positivos de reparación se muestran en negritas y datos nulos en itálicas.

Los resultados de los 4 diferentes puntos en que se evalúa el daño genotóxico (basal, inducido, a 25 y 50 min) se normalizaron mediante cálculo de porcentajes para cada uno de los individuos, donde el valor medio para el daño basal equivale a 0%, por lo que al restar este valor medio al de los otros tres puntos, y considerando que la diferencia entre el valor medio del daño basal y el valor medio del daño inducido equivale al 100%, se obtienen porcentajes de daño remanente después de los dos tiempos de reparación. A continuación, los porcentajes así calculados para cada uno de los tiempos de reparación son restados a un 100%, de forma tal que se producen valores de reparación neta a estos tiempos. Matemáticamente, es posible conseguir valores positivos de reparación superiores al 100%, lo que indica una reparación no solo del daño inducido, si no también del daño basal, así como valores negativos, en cuyo caso fueron igualados a cero. Los resultados observados en la tabla 2 muestran una serie de comportamientos diversos dentro de los tres grupos estudiados. Si bien no existen diferencias significativas en cuanto a promedios grupales, es notable que todos los promedios de reparación se encuentran debajo del 50% aún después de 50 minutos. No así, al analizar los resultados individuales de exposición a VOCs y plomo, el comportamiento dentro de los grupos resulta más homogéneo (tabla 3).

Tabla 3.- Resultados individuales de la determinación de VOCs y plomo en los diversos grupos de exposición.

Gasolineros

Individuo	Plomo	Meta,Para-Xileno	Orto-Xileno	Benceno	Benceno en aire
4	9.40	n.d.	n.d.	8.84	0.77
5	8.50	n.d.	n.d.	9.79	0.82
6	11.20	n.d.	n.d.	6.22	0.58
10	12.90	3.15	0.97	4.43	0.34
11	8.90	3.04	1.12	3.13	0.24
12	8.00	2.80	1.06	4.70	0.25
18	11.20	3.70	1.26	1.79	0.13
22	5.00	59.74	19.28	2.93	0.22
24	8.60	5.89	1.95	6.06	0.44
25	14.30	4.84	1.69	4.63	0.33
29	15.40	2.71	1.06	3.63	0.26
30	8.30	4.52	1.49	4.77	0.35
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	4.50	3.32	1.15	4.44	0.33
33	9.30	4.42	1.65	4.61	0.34
40	7.90	2.82	0.96	5.53	0.47
41	16.90	1.52	0.55	2.24	0.21
42	10.10	1.79	0.65	2.51	0.46
43	8.80	1.91	0.68	3.19	0.29
44	14.00	2.27	0.78	4.83	0.45
45	5.20	4.83	1.64	5.51	0.57
46	7.80	1.58	0.56	3.01	0.27
47	5.20	1.94	0.88	3.96	0.37
48	8.60	2.32	0.81	4.88	0.46
49	5.10	1.81	0.63	3.86	0.36
50	6.70	1.73	0.63	2.31	0.22
51	11.20	1.72	0.63	1.76	0.16
<b>Promedio</b>	<b>9.35</b>	<b>5.41</b>	<b>1.83</b>	<b>4.37</b>	<b>0.37</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>± 3.32</b>	<b>± 11.91</b>	<b>± 3.83</b>	<b>± 1.93</b>	<b>± 0.17</b>

Tabla 3

(cont.):

T.v.p.

Individuo	Plomo	Meta,Para-Xileno	Orto-Xileno	Benceno	Benceno en aire
3	17.50	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.51	0.07
7	10.10	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.12	0.10
16	12.00	0.86	0.31	0.69	0.06
17	16.30	0.84	0.28	0.58	0.05
21	9.50	0.96	0.37	1.18	0.11
27	6.70	0.81	0.29	0.68	0.05
28.	12.50	1.14	0.43	0.88	0.06
<b>Promedio</b>	<b>12.09</b>	<b>0.92</b>	<b>0.34</b>	<b>0.81</b>	<b>0.07</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>± 3.81</b>	<b>± 0.13</b>	<b>± 0.06</b>	<b>± 0.26</b>	<b>± 0.02</b>

Oficinistas

Individuo	Plomo	Meta,Para-Xileno	Orto-Xileno	Benceno	Benceno en aire
2	26.20	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.44	0.03
8	8.80	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.33	0.03
9	16.30	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.37	0.03
13	5.80	0.42	0.16	0.46	0.03
14	16.90	0.79	0.29	0.74	0.06
15	8.00	0.57	0.22	0.86	0.07
19	13.20	0.40	0.15	0.46	0.40
20	13.00	0.58	0.22	0.51	0.58
26	13.00	0.73	0.26	0.56	0.05
34	6.90	0.63	0.24	0.86	0.07
<b>Promedio</b>	<b>12.81</b>	<b>0.59</b>	<b>0.22</b>	<b>0.56</b>	<b>0.14</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>± 6.07</b>	<b>± 0.15</b>	<b>± 0.05</b>	<b>± 0.19</b>	<b>± 0.19</b>

Benceno y xilenos: µg/dl, determinados por cromatografía de gases de purga

y trampa; plomo: µg/dl, determinado por espectrometría de masas.

Toda vez que al comparar los promedios obtenidos para cada grupo y tiempo de reparación, no se encuentran diferencias significativas entre éstos, la

comparación con el grupo testigo histórico evidencia una alteración en los tres grupos muestreados (tabla 4). Los mismos resultados son reportados en forma de gráfica de cinética de reparación en la gráfica de la figura 5.

**Tabla 4: Porcentajes de reparación por grupos de exposición**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Gasolineros</b>	<b>Oficinistas</b>	<b>T.v.p.</b>	<b>Testigo histórico</b>
<b>25</b>	<b>39.96 ± 32.49</b>	<b>46.85 ± 36.05</b>	<b>53.45 ± 46.2</b>	<b>59.75 ± 12.24</b>
<b>50</b>	<b>33.26 ± 31.42</b>	<b>45.22 ± 37.76</b>	<b>43.42 ± 42.81</b>	<b>95.3 ± 12.66*</b>

Promedios ± desviaciones estándar, en porcentajes. Determinados por SCGE.

\*p<0.05.

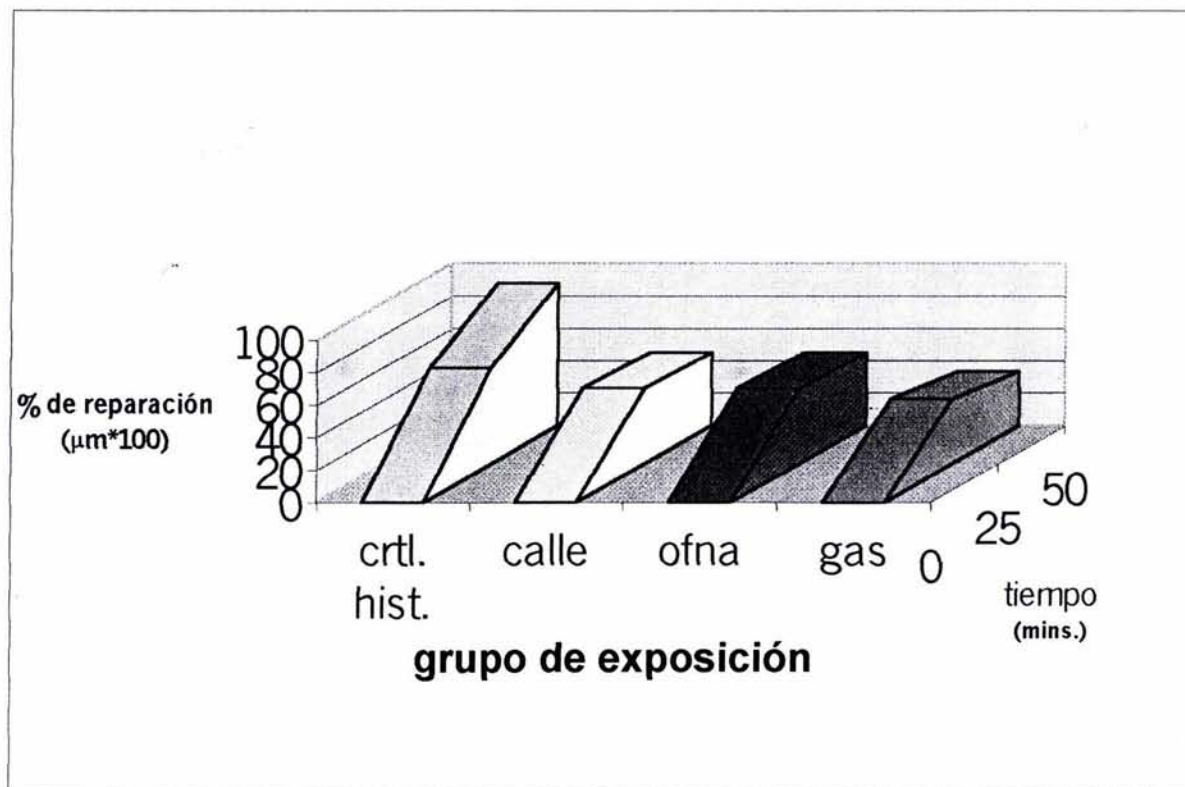
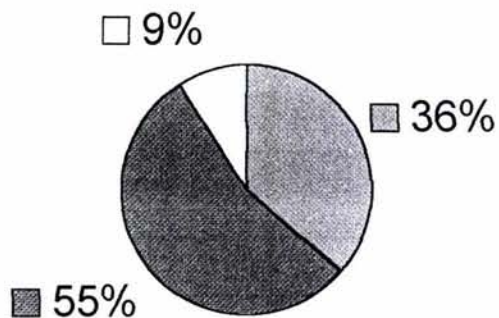


Figura 5. Cinéticas de reparación: promedios de grupos. Acotaciones: gas : gasolineros; ofna : oficinistas; t.v.p. : trabajadores de la vía pública; ctrl. hist. : testigo histórico.

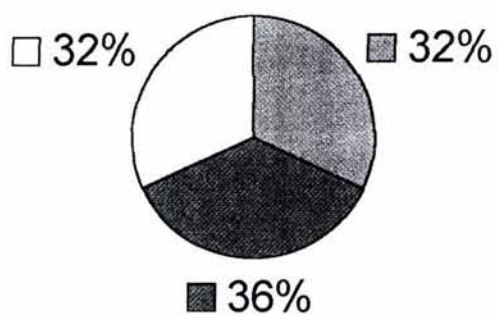


Dados estos resultados, y basados en la observación de que después de 15 minutos de reparación, una célula sana debe haber reparado al menos el 50% del daño inducido, y que después de entre 60 y 120 minutos la totalidad de éste (Tice y Strauss, 1995; Rojas *et al.*, 1999), a continuación se categorizan los *Individuos* de acuerdo con las cinéticas de reparación. Cuando los resultados de reparación a 25 y 50 min son mayores a 50%, el *Individuo* se considera dentro del subgrupo de "reparación no afectada", para el tiempo indicado. Aquellos *Individuos* cuya reparación se encuentra entre el 0% y el 50% son catalogados dentro del subgrupo de reparación afectada. Cualquier otro resultado es asumido igual a 0% y el *Individuo* dentro del subgrupo de reparación nula. Los subgrupos resultantes se muestran en las figuras 6a, 6b; 7a, 7b; 8a y 8b.

### a) gasolineros - reparación a 25 min



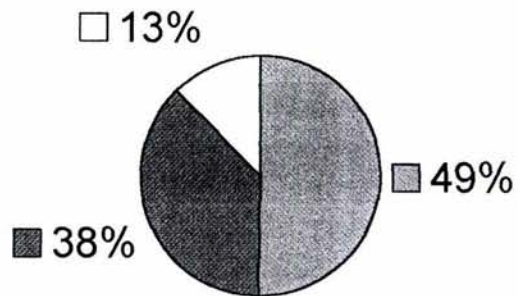
### b) gasolineros - reparación a 50 min



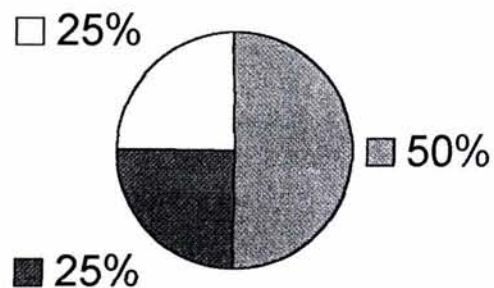
- Reparación No Afectada
- Reparación Afectada
- Reparación Nula

Figuras 6a y 6b. Proporciones de las diferentes categorías de reparación observadas dentro del grupo "gasolineros".

### a) oficinistas - reparación a 25 min



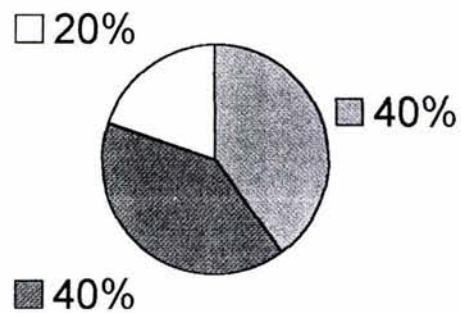
### b) oficinistas - reparación a 50 min



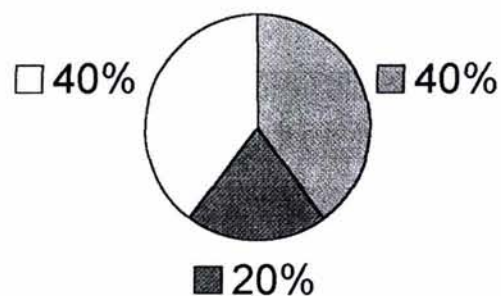
- Reparación No Afectada
- Reparación Afectada
- Reparación Nula




Figuras 7a y 7b. Proporciones de las diferentes categorías de reparación observadas dentro del grupo "oficinistas"

### a) t.v.p. - reparación a 25 min



### b) t.v.p. - reparación a 50 min



-  Reparación No Afectada
-  Reparación Afectada
-  Reparación Nula

Figuras 8a y 8b. Proporciones de las diferentes categorías de reparación observadas dentro del grupo "trabajadores de la vía pública".

En cuanto a las proporciones de individuos con diversos estados de reparación, existe una diferencia para los 50 min, donde el porcentaje de gasolineros cuya reparación no fue afectada fue significativamente menor ( $p = 0.042$ ) a la observada entre oficinistas y t.v.p., lo que se muestra en la tabla 5b.

Tabla 5. Proporciones de individuos con diferentes cinéticas de reparación dentro de los grupos principales

<b>Grupos de Exposición</b>	<b>Reparación No Afectada</b>	<b>Reparación Afectada</b>	<b>Reparación Nula</b>
<b>Gasolineros</b>	<b>36.36%</b>	<b>54.54%</b>	<b>9.09%</b>
<b>T.v.p.</b>	<b>40%</b>	<b>40%</b>	<b>20%</b>
<b>Oficina</b>	<b>50%</b>	<b>37.5%</b>	<b>12.5%</b>

a) Proporciones halladas a los 25 minutos.

<b>Grupos de Exposición</b>	<b>Reparación No afectada</b>	<b>Reparación Afectada</b>	<b>Reparación Nula</b>
<b>Gasolineros</b>	<b>31.81%</b>	<b>36.36%</b>	<b>31.81%</b>
<b>T.v.p.</b>	<b>40%</b>	<b>20%</b>	<b>40%</b>
<b>Oficina</b>	<b>50%*</b>	<b>25%</b>	<b>25%</b>

b). Proporciones halladas a los 50 minutos.\* $p=0.042$ , prueba de Fisher.

Por último, los datos de reparación no presentan correlación con las variables medidas de manera individual, incluyendo aquellas propiamente monitoreadas, como concentración de benceno en aire.

Sin embargo, entre los trabajadores de las gasolineras existe una correlación múltiple negativa entre la reparación (% a 25 min) y las siguientes variables: edad, años de trabajo, número de cigarrillos fumados al día, plomo en sangre y benceno en sangre ( $R = 0.649$ ), donde las variables que mejor se ajustan a la función son: plomo ( $p = 0.065$ ) y benceno ( $p = 0.021$ ), *vid* tabla 6. Otras correlaciones múltiples fueron inexistentes.

Tabla 6: Desglose de la correlación lineal múltiple.

% de reparación a 25 min = $131.542 + (0.370 * \text{edad}) - (1.094 * \text{años}) - (1.541 * \text{número de cigarrillos}) - (4.490 * \text{pb en sangre}) - (10.249 * \text{benceno en sangre})$					
N = 18.000 Observaciones Faltantes= 16					
R = 0.649 R <sup>2</sup> = 0.421 R <sup>2</sup> ajustada= 0.180					
Error estándar del Estimado = 35.025					
	Coeficiente	Error est.	t	P	VIF
Constante	131.542	46.808	2.810	0.016	
edad	0.370	1.377	0.269	0.793	1.381
años	-1.094	1.642	-0.666	0.518	1.245
no. cigarrillos	-1.541	3.086	-0.499	0.627	1.195
pb sangre	-4.490	2.212	-2.030	0.065	1.816
benceno	-10.249	3.870	-2.648	0.021	1.567
Análisis de Varianza:					
	DF	SS	MS	F	P
Regresión	5	10703.726	2140.745	1.745	0.199
Residual	12	14720.624	1226.719		
Total	17	25424.350	1495.550		

Tabla 6 (cont.)

"La variable dependiente % de reparación a 25 min puede ser predicha a partir de una combinación lineal de las variables independientes:

	P
edad	0.793
años	0.518
cigarros	0.627
pb sangre	0.065
benceno	0.021"

Prueba de Normalidad: Pasada (P = 0.837)

Prueba de Varianza Constante: Pasada (P = 0.535)

Poder de la Prueba Realizada con alfa = 0.050: 0.850.

Finalmente, es importante mencionar que entre los diversos subgrupos dentro de la misma categoría de reparación no existen en ningún caso diferencias significativas.

## DISCUSIÓN

### 0. De los niveles de exposición a VOCs y plomo.

Diversos puntos respecto a los niveles de exposición determinados en este estudio resultan difíciles de dilucidar, como el alto nivel de plomo presente entre los oficinistas y t.v.p. ( $>12 \mu\text{g}/\text{dl}$ ), superiores a los  $10 \mu\text{g}/\text{dl}$ , establecidos como norma propuesta por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EEUU ([www.who.int](http://www.who.int)), así como su ligera, mas presente exposición a benceno y xilenos. Por el lado del plomo, si bien la gasolina actualmente sólo contiene una pequeña cantidad de este metal, la exposición de las vías respiratorias a los desechos de procesos de combustión, más la existencia de tuberías antiguas (fabricadas con plomo) y el almacenaje de agua para beber en recipientes de barro es una realidad en este país (SEMARNAP, 1996). En cuanto al benceno y los xilenos, una fuente de exposición continúa siendo en principal medida la contaminación atmosférica, dado que no se les encuentra fácilmente en la vida cotidiana. Además, no existen regulaciones claras respecto a las cantidades de estos compuestos en el ambiente, sin embargo, la Comisión Europea ha impuesto como límites de exposición los  $3.25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ([www.aromaticsonline.net](http://www.aromaticsonline.net)), con lo cual el promedio de exposición ocupacional de los individuos incluidos en este estudio ( $0.24 \pm 0.2 \text{ mg}/\text{m}^3$  en general,  $0.37 \pm 0.17 \text{ mg}/\text{m}^3$  entre gasolineras) se encuentra sensiblemente por encima de esta norma.



## 1. Del daño basal

A diferencia de lo reportado por otros estudios, realizados en diversos países europeos como España e Italia, en los cuales también fue implementada la técnica del Cometa, y en los que encontraron que su grupo de trabajadores expuestos (gasolineros) tuvo un nivel de daño basal mayor comparado contra su grupo testigo (Anderson *et al.*, 1996; Andreolli *et al.*, 1996; Pitarque *et al.*, 1997), en el presente estudio no hubo en ningún caso evidencia de un mayor daño en cualquiera de los grupos. A pesar de esto, es notable la existencia de una mayor dispersión entre el grupo de los gasolineros comparado particularmente con los oficinistas. Esto a su vez concuerda con los datos encontrados por diversos autores (tabla 7), siendo las dispersiones de esta investigación comparables con las suyas en cuanto a los grupos expuestos y los testigos negativos. La inexistencia de diferencias en este estudio puede ser resultado de un número de muestra insuficiente, particularmente en lo que al testigo negativo (oficinistas,  $n = 10$ ) se refiere. Asimismo, la presencia de un par de individuos con registros de daño basal exacerbado, un gasolinero y un t.v.p. es notable, amén de que ninguno de los dos tuvo una inducción de daño significativa.

Tabla 7: Comparación de los resultados de este estudio con otros publicados.

Estudio	Exposición	n	índice de daño*	referencia
Tovalín	Contaminantes aéreos	35	1.500886211	Tovalín et al., en preparación.
Carere	Vapor de gasolina	24	1.574324324	Carere et al., 2002
Marcos	Petróleo (aeropuerto)	42	1.100338491	Istituto Superiore di Sanita, 1997
Sul	Benceno- linfocitos T	82	1.19047619	Sul et al., 2002
Sul	Benceno- linfocitos B	82	2.556291391	Sul et al., 2002
Sul	Benceno- granulocitos	82	1.388461538	Sul et al., 2002
Carere	Contaminantes aéreos	190	1.277777778	Istituto Superiore di Sanita, 1997
Pitarque	Tolueno	37	1.134078212	Pitarque et al., 1999
Andreoli	Vapor de gasolina	24	2.021276596	Andreoli et al., 1997
Anderson	Benceno	23	1.020833333	Anderson et al., 1995
Anderson	Ácido mucónico	23	0.944444444	Anderson et al., 1995
Anderson	Hidroquinona	23	1.1	Anderson et al., 1995
Anderson	P-benzoquinona	23	3	Anderson et al., 1995
presente trabajo	Vapor de gasolina (gas y t.v.p. / ofna)	37	1.191489686	-
presente trabajo	Vapor de gasolina (gas, t.v.p. y ofna / ctrl. hist.)	59	1.852407528	-

\* Índice de daño calculado como: daño en el grupo expuesto / daño en el grupo control. Daño determinado en todos los casos mediante SCGE.

Es importante señalar que en los tres grupos se encontraron individuos cuyos valores de daño basal excedieron notoriamente las medias grupales. En la población de los gasolineros el *Individuo 25*, cuyo daño basal fue exorbitante, y en menor grado los *Individuos 12 y 45*. Entre los oficinistas, el *Individuo 20* rebasó ligeramente la marca de la media más una desviación estándar; mientras entre los t.v.p., el *Individuo 28* fue el del mayor registro. De entre estos *Individuos*, algunos no tuvieron una inducción exitosa de daño por peróxido, lo cual se discute adelante.

## 2. De la inducción de daño mediante peróxido

Si bien el tratamiento con peróxido de hidrógeno tuvo diferentes grados de acción sobre las células de los diversos individuos, no en todos los casos el daño inducido fue significativamente mayor que el basal; por lo cual varios individuos no fueron tomados en cuenta para el estudio de cinética de reparación.

De estos individuos, quienes no fueron incluidos en análisis subsecuentes, pertenecen 2 al grupo de gasolineros, 2 al de oficinistas y 2 al de t.v.p. A saber:

Entre los gasolineros, los *Individuos 29 y 45* corresponden a esta categoría. Los valores de daño basal de ambos son mayores a la media grupal. Lo que es más, el *Individuo 45* se encuentran más allá del valor medio más una de. de daño basal. Este *Individuo* reportó fumar, estar expuestos a pinturas vinílicas y comer junto a las bombas; En cuanto al *Individuo 29*, su edad (31 años) y tiempo trabajando (12 años) son mayores a la media grupal; asimismo, tiene una concentración de plomo en sangre superior a 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y se reportó expuesto a fertilizantes. La característica del plomo, así como una edad superior al promedio grupal (38.7 años) la comparten los *Individuos 19 y 20*, con la peculiaridad de que el *Individuo 19* también fuma, sin embargo, su daño basal es menor al promedio de su grupo; no así, el del *20*, máximo en el grupo. Por último, los *Individuos 3 y 28*, trabajadores de la vía pública, también comparten la característica de la elevada concentración de plomo en sangre, y aun cuando sus edades son menores (26 y 18 años), también sus índices de daño basal son los mayores dentro de su grupo. Además, ambos estuvieron expuestos a pintura vinílica, más la exposición del *Individuo 3* a disolventes por un lado, y a tabaco y pegamento por parte del *Individuo 28*.

El tema de la exposición a plomo y disolventes es común dentro de este grupo de *Individuos* sin inducción de daño; sin embargo, la exposición a plomo no es significativamente mayor a la general. A pesar de que el 19 no presentó un daño basal superior al promedio, su inclusión en este grupo señala una alteración tras dichas exposiciones. Apuntando los casos particulares de los *Individuos* 3, 12, 45 y 28; los cuales presentan algunos de los más altos resultados de daño basal, éste sugiere haber sido tan extenso que un daño inducido hubiese resultado indetectable. Cuando consideramos este grupo de *Individuos*, y los comparamos con el resto de la población muestreada en cuanto a daño basal se refiere, obtenemos una importante diferencia significativa ( $p=0.004$ ), donde el daño del grupo sin inducción es claramente mayor (ver tabla 8), lo cual nos da un indicio de que en realidad sí comparten una condición afectada; sin embargo, entre los parámetros evaluados no existen diferencias que permitan explicar esta condición, por lo que sería por demás interesante continuar con un seguimiento a estos *Individuos*.

Tabla 8: resultados del daño basal de los grupos de individuos con y sin inducción de daño por peróxido

	Inducción de Daño	No Inducción de Daño
Promedio	14.4837	22.4708*
Desv. est.	7.2781	5.8354
N	38	6

Determinado por SCGE (micrómetros). \*  $p=0.004$ , prueba t de Student.

3. De las características particulares de cada individuo y la relación de éstas con su capacidad de reparación.

Dada la pequeña cantidad de individuos incluidos en el estudio, así como la cantidad y características de los datos de ellos obtenidos, además de la falta de diferencias a nivel grupal, el análisis ha sido extendido a una serie de estudios de caso, particularmente de aquellos con las cinéticas de reparación más inusuales y los resultados de encuesta y/o determinación de VOCs más interesantes.

- Entre Gasolineros:

Entre éstos se pueden distinguir por exposición aquellos con concentraciones de plomo en sangre mayores a 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , aquellos con exposiciones significativas a benceno y/o xileno y otros. De los primeros es importante mencionar a los *Individuos 18, 42 y 51*, quienes presentaron cinéticas de reparación que decayeron entre los 25 y 50 min. El *Individuo 18* particularmente, tuvo un bajo índice de reparación a los 25 min (8%), que se tornó nulo al final, siendo que come junto a las bombas y su edad (41 años) es mayor al promedio grupal (29.3 años). Del *Individuo 51*, quien fuma, su reparación no llegó a ser nula. Sin embargo, el *Individuo 42*, quien comparte las tres condiciones (plomo, fumar, comer junto a las bombas) tiene en cambio un último índice de reparación ligeramente menor al 50% (45%), si bien su edad es menor a la del promedio (22 años). En otro extremo se halla el *Individuo 41*, con una edad

mayor a la de la media (32 años), y una cinética de reparación que de afectada se convierte en no afectada, aunque nunca se aleja del 50%.

En cuanto a los *Individuos* con alta exposición a benceno o xilenos (4, 5, 22, 24, 30, 32, 33, 40, 48 y 49), los hay fumadores (4, 22 y 33) quienes presentan resultados positivos (>50%) o en su defecto, ascendentes, siendo además su edad menor al promedio. No así entre quienes además comen junto a las bombas (5, 40, 48 y 49) existen los casos en que la reparación decrece incluso a la nulidad (48, de 36% a 8% e *Individuo* 49, de 69% a 0%), así como los que mostraron resultados ascendentes y/o mayores al 50%. Cabe señalar que el *Individuo* 40 tiene 40 años de edad y está expuesto a pegamento, disolventes, pintura vinílica y come junto a las bombas. Finalmente, aquellos que sólo tuvieron altas concentraciones de benceno (*Individuos* 24, 30 y 32) presentaron reparaciones afectadas (<50%) o disminuyeron a cero (el caso del *Individuo* 30, quien de un índice de más de 100% llegó a 0% para los 50 minutos, sin alguna diferencia particular comparado con los otros dos).

Existe además un grupo de gasolineros con altas concentraciones tanto de plomo como de benceno: *Individuos* 6, 10, y 44, quienes además fuman. De entre ellos, el *Individuo* 10 mostró una reparación no afectada en todo momento, mientras que los otros dos tuvieron reparación afectada o nula, sin mayor evidencia de diferencias entre hábitos o exposiciones.

De los restantes (*Individuos* 11, 31, 46 y 50), tanto el 11 como el 50 fuman, mas sus resultados siempre son ascendentes (*Individuo* 11, de 18% a 27% e *Individuo* 50, de 35% a 89%), y no presentan más diferencias, por lo que podría esperarse que con tiempo suficiente el *Individuo* 11 terminaría por reparar todo el

daño inducido. Del *Individuo 31*, no hay datos disponibles de exposición o hábitos, por lo que no se puede discernir una posible causa de su nula reparación; en cambio, el *Individuo 46*, cuya reparación no sólo fue nula, sino que incluso su daño remanente a los 50 min fue cercano al 300% del valor inicial, se reportó haber estado expuesto a radiación, por lo que su situación es evidente.

A partir de lo anterior se puede decir que:

- Las cinéticas de reparación de los *Individuos* que tienen concentraciones altas de plomo no siguen patrón alguno.
- Los fumadores con altas concentraciones de benceno o xilenos presentan cinéticas ascendentes, que se podrían adjudicar a niveles de enzimas de reparación constantemente altos por la condición de fumar, lo que además ya se ha sugerido (Slupphaug *et al.*, 1992).
- Los únicamente expuestos a benceno tuvieron cinéticas de reparación afectadas.
- Los fumadores que tienen altas concentraciones de plomo y benceno tampoco siguen cinéticas similares.

Y de acuerdo con esto:

- El plomo no es una causa precisa de la deficiencia en la reparación, pero puede ser un cofactor para ésta.
- La exposición únicamente a benceno tiene un efecto detrimento sobre la reparación.
- El benceno en conjunto con los xilenos parecen tener relaciones de competencia en cuanto a su efecto sobre la

reparación, aunque se ha reportado que por exposiciones separadas el contacto con benceno o xilenos implican riesgo de carcinogénesis (Melham, 1991; Porru *et al.*, 2001).

- Y aunque la carcinogénesis puede relacionarse con la ineficiente reparación del daño al ADN, se ha reportado que el benceno parece no tener injerencia sobre la reparación (Hallberg *et al.*, 1995).

- Entre Oficinistas:

Es importante notar que la mitad de estos Individuos estuvo en algún momento dentro de la categoría de "reparación no afectada". De entre éstos, tres de ellos fuman y presentan altas concentraciones de plomo en sangre (Individuos 2, 9 y 14). Las cinéticas de reparación muestran que tanto el Individuo 2, como el 9 tuvieron una reparación positiva pero pobre tras 25 min (8% y 27%), que para los 50 min resultó mayor al 50%, lo cual sugiere un cierto retardo en el inicio de la misma, con la particularidad de que el Individuo 2 estuvo expuesto a disolventes y pintura vinílica. No así, el Individuo 14, quien también estuvo expuesto a disolventes y pegamento, y su edad (40 años) es mayor al promedio (38 años), tuvo una reparación no afectada en ambos tiempos, aun cuando ésta también siguió una trayectoria ascendente (de 68% a 95%). Se podría sugerir que dadas las cinéticas observadas, y la escasa diferencia en las exposiciones entre los Individuos 2 y 14, los resultados de reparación de los tres Individuos hubiesen resultado "no afectados" si el primer tiempo para medir el daño remanente se hubiese prolongado.



En cuanto a los *Individuos* cuyos índices de reparación decayeron (13 y 34) la única exposición riesgosa reportada común fue la pintura vinílica. El *Individuo 34*, quien además es el mayor en la población muestreada (63 años), estuvo expuesto a disolventes, y no sería extraño ver un resultado nulo de reparación para él dado el tiempo suficiente, aunque sus resultados tras los tiempos observados se encuentran cerca del 50%. Al final, los *Individuos 8 y 26* no reportaron exposición riesgosa alguna, pero sus cinéticas de reparación fueron totalmente diferentes, siendo la del menor (*Individuo 8*, 21 años) siempre mayores a 50%; y la de mayor –con concentración de plomo en sangre mayor a 10 µg/dl–, siempre nulas (*Individuo 26*, 54 años).

Cabe mencionar que la ingestión de bebidas alcohólicas dentro de este grupo es generalizada, lo que puede ser la más clara contribución a la ineficiencia de este grupo como testigo (condición planteada por su no exposición a vapores de gasolina) del estudio, lo cual es evidente dado su alto promedio de daño basal, y a pesar del porcentaje de *Individuos* con reparación no afectada tras 50 min, como se detalla posteriormente en el apartado 4.

En general:

- Presentan el mayor nivel de plomo en sangre ( $12.81 \pm 6.07$  µg/dl)
- Alrededor del 70% fuma.
- 100% ingiere alcohol. El etanol ha sido relacionado con deficiencias en la reparación de daño a ADN, particularmente en

mitocondrias (Blaziak *et al.*, 2000; Cahill *et al.*, 1999, Wieland y Lauterburg, 1995).

- El acetaldehído, principal metabolito del etanol, se ha descrito como causante de daño al ADN y a la reparación del mismo (Singh y Khan, 1995).

Por lo que:

- El grupo no puede ser considerado como un testigo apropiado.
- La combinación plomo-etanol pudiese ser la responsable de los resultados obtenidos en este grupo.

- De los Trabajadores de la Vía Pública

Las altas concentraciones de plomo en sangre son comunes dentro de este grupo. Además de aquellos sin inducción de daño, los *Individuos 7, 16 y 17* también las presentan. De ellos, tanto el *Individuo 7* como el *Individuo 17* son fumadores, además de que el *7* reportó exposición a pegamento, pintura vinílica y disolventes, sin embargo, ambos tuvieron índices de reparación positivos. Al contrario, el *Individuo 16* fue el que presentó los peores resultados dentro del grupo, siendo sus índices de reparación nulos tanto a 25 como a 50 min: inclusive, su edad (20 años) es menor que la de los mencionados y que la media grupal (28 años). Por último, los *Individuos 21 y 27*, quienes no reportaron exposiciones riesgosas pero su edad es mayor al promedio (36 y 31 años), presentaron resultados totalmente diferentes, donde el *21* tiene índices de reparación cercanos a lo ideal, mas el *27* mostró una reparación nula. Es evidente que dentro de este grupo, más allá del tema del plomo y

la edad, que no resultan determinantes, no existe una condición común que pudiese explicar las diferentes cinéticas de reparación entre los *Individuos* a él pertenecientes.

La descripción anterior permite de alguna forma concluir que no existe del todo un conjunto de características que permita predecir una afectación de los sistemas de reparación de ADN dañado. A pesar de la correlación múltiple negativa encontrada entre el índice de reparación a 25 min y una serie de variables, el hecho de que dicho índice no se conserve a los 50 min indicaría que esta serie de variables solo es determinante de la eficiencia de los primeros estadios de la reparación; asimismo es posible que una vez que la reparación inicia, las diversas vías a través de las cuales se realiza son independientes de las variables mencionadas y en el último de los casos, se estén llevando a cabo dos procesos de reparación diferentes, de los cuales el segundo en orden temporal se encontraría afectado.

Generalizando:

- No existe una tendencia clara en cuanto a cinéticas de reparación.
- No hay tampoco una exposición riesgosa generalizada.

Por otro lado, si bien el cuestionario y la determinación de VOCs realizados arrojan una cantidad de datos importantes, estos no son en forma alguna absolutos o específicos, amén de la subjetividad con la que el cuestionario puede ser respondido. A partir de ahí, y como un ejemplo, podemos hacer conjeturas respecto a qué considera un *Individuo* estar expuesto a un disolvente, qué tipo de disolvente sería, qué considera disolvente propiamente dicho, si considera que haber estado expuesto una vez “muy poco” le permite responder que no, etc.

En cuanto a los *Individuos* cuya cinética de reparación les coloca en un grupo diferente entre los 25 y 50 min, de entre éstos se pueden discernir dos grupos diferentes: aquellos cuyo índice de reparación mejora entre el primer y segundo tiempo (*Individuos 2, 4, 5, 9, 41 y 50*), y aquellos para quienes dicho índice decae (*Individuos 7, 13, 18, 27, 30, 31, 34, 42, 44, 46, 49 y 51*). Los primeros pueden pensarse que son el resultado de un inicio retrasado en los mecanismos de reconocimiento y reparación del daño, que de alguna forma no es grave, desde el supuesto de que dado el suficiente tiempo el daño será totalmente reparado. Los segundos en cambio, podrían estar en una situación más comprometedor, puesto que -a pesar de que tienen algún grado de reparación inicial (afectada o no)- el daño remanente se incrementa con el tiempo, lo cual sugiere una afectación de alguna etapa terminal del proceso de reparación de daño, como podría ser la presencia de una enzima de la magnitud de la ligasa en mal funcionamiento; todo esto a excepción de algunos individuos (*18, 31, 44, y 46*) quienes desde los 25' min habían mostrado un índice de reparación paupérrimo (menor al 15%) que después fue nulo, y de quienes se puede pensar que sus sistemas de reparación en general están francamente afectados.

#### 4. De los diferentes grupos muestreados, el cigarro y el alcohol.

Por principio, se presenta el hecho de que a pesar de la elección hecha del grupo oficinista como testigo, las cinéticas de reparación para tales individuos muestran que si bien su exposición a vapores de gasolina es mínima, su capacidad de reparación se encuentra en iguales o peores condiciones que las del grupo expuesto ocupacionalmente. Uno de los factores que podrían considerarse de

confusión para el hallazgo de tales resultados es el hecho de que una proporción de ellos (37.5%) son fumadores activos. Esta característica se encuentra también en los otros dos grupos muestreados, siendo un 63% fumadores activos entre los gasolineros, así como un 40% entre los trabajadores de la vía pública.

El tabaco es bien conocido como un agente que causa daño genotóxico (Rojas *et al.*, 1996) y se sabe asimismo que cada cigarrillo contribuye con una ligera cantidad de benceno y otros compuestos aromáticos similares a los encontrados en los vapores de gasolina (Scherer *et al.*, 1995). De la misma forma se ha documentado una correlación directa entre su consumo y el desarrollo de “neoplasias” del tracto respiratorio, principalmente ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)).

Al dividir los diversos grupos en fumadores y no fumadores no se obtienen diferencias significativas. Por otro lado, es importante notar la pérdida de importancia estadística del grupo de los trabajadores de la vía pública, debido a su reducido número, que una vez realizada esta discriminación se ve aún más disminuido. Sin embargo, al comparar los diversos resultados de daño y reparación obtenidos entre grupos de fumadores y no fumadores, independientemente de su grado de exposición, existen diferencias significativas ( $p = 0.034$ ) para los índices de reparación a 50 min, lo que apunta directamente a que el consumo de tabaco es en verdad un factor coadyuvante en la generación de daño al ADN en este estudio.

Por otro lado, es importante mencionar el consumo de alcohol, bastante generalizado entre dos de los tres grupos. De tal forma, el 100% de los oficinistas declaró consumir alcohol regularmente. A partir de este punto es que consideramos que tal factor de confusión fue determinante para los resultados de dicho grupo,

originalmente propuesto como testigo dada su “baja exposición”. Entre los gasolineros, 19 de ellos (73.1%) reconoció ingerir alcohol, siendo que 2 de ellos declararon en el cuestionario incluso no haberlo hecho. En cambio, entre los t.v.p., sólo 2 de ellos (entre ellos el *Individuo 28*) manifestaron consumir bebidas alcohólicas regularmente, mientras sólo uno de ellos mencionó no haberlo hecho nunca.

Sin embargo, cuando se comparan los resultados del grupo de gasolineros ajenos al alcohol contra el de aquellos habituados al mismo, no existen diferencias significativas.

#### 5. De la comparación de los grupos contra un grupo histórico.

Dados los resultados obtenidos en las distintas comparaciones realizadas, y la presencia de importantes factores de confusión como los hábitos de alcoholismo y tabaquismo, se decidió comparar el total de los resultados de daño basal por grupo contra un testigo histórico del laboratorio, en los que se nota de manera clara que todos los grupos muestreados presentan índices de daño mayores a la media de una población históricamente muestreada, nativa a su vez de esta misma ciudad. De la misma manera, las cinéticas de reparación por grupo se muestran claramente más afectadas para los diferentes grupos de exposición de este estudio (figura 5), comparados con el testigo histórico mencionado.

## 6. De las diferencias dentro del grupo de gasolineros

Al enfocarse directamente sobre el grupo de más alta exposición, e independientemente de la falta de diferencias contra los otros grupos de exposición, se pueden apuntar varias características particulares:

Dividiendo el grupo entre aquellos con reparación mayor a 50%, y aquellos sin tal característica, los promedios de daño basal no tienen diferencias significativas entre sí. Sin embargo, comparados contra el testigo histórico ( $8.4068 \pm 3.6982 \mu\text{m}$ ), y aún contra los promedios del grupo de reparación no afectada ( $12.091 \pm 0.8273 \mu\text{m}$ ), existe una diferencia significativa.

Entre los 4 subgrupos resultantes: “reparación no afectada a 25 minutos”, “reparación afectada o nula a 25 minutos”, “reparación no afectada a 50 minutos”, y “reparación afectada o nula a 50 minutos”; existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los promedios de reparación de los subgrupos correspondientes al mismo orden temporal.

Asimismo, una correlación se hace evidente en este punto: el subgrupo de reparación afectada o nula muestra una correlación positiva entre los índices de daño basal y los niveles de plomo en sangre ( $R = 0.6423$ ), lo que sugiere una vez más el papel determinante que tiene el plomo sobre la cinética del daño al material genético, donde bien puede inhibir la inducción del daño, o bien (a concentraciones ligeramente más bajas) estar relacionado directamente con un incremento de éste.

El que se hayan encontrado niveles de plomo por encima de la norma (10 $\mu$ g/dl), a pesar de que en las gasolinas modernas está en una proporción muy pequeña (0.013 g/dl [www.energia.gob.mx]) puede deberse por un lado a que este elemento tiende acumularse con el paso del tiempo; y por otro lado, a eventos como tuberías de plomo y contenedores de agua de barro, lo que explicaría porqué también son altos los niveles de dicho metal entre oficinistas y t.v.p.

## 7. Del benceno y la gasolina

La cantidad de benceno reportada en las gasolinas mexicanas (1.5-2%) no es significativamente menor que la cantidad presente en las gasolinas europeas (2-2.6%) (Petróleos Mexicanos, 1996). El benceno está reportado como un carcinógeno importante, promotor de leucemias (www.iarc.fr). Sin embargo, una incidencia importante de leucemias en trabajadores de gasolineras no se ha descrito. Por un lado, no existen seguimientos en México que así lo reporten, y es posible que una diferencia, sobretodo de carácter operacional exista tanto con Europa como con Estados Unidos, donde las condiciones de seguridad, así como la existencia de una alta proporción de gasolineras de autoservicio evita una exposición importante a los vapores del combustible para determinadas personas sobre extensos períodos de tiempo. Otro punto interesante sería ahondar en la relación que comparten benceno, tolueno, xileno, plomo, metil-terbutiléter, etc., pues se ha hallado que si bien ratas expuestas a benceno vaporizado desarrollan leucemias, la mezcla de benceno, tolueno y xileno no tuvo tal efecto. A partir de eso, se puede proponer una relación competitiva entre éstos. Incluso, el *Individuo 22*, con el mayor registro de meta y para-xileno, calificó dentro del grupo de reparación no afectada, si bien esto no es un dato determinante para el desarrollo de una leucemia en ningún caso.



Por último, es evidente que independientemente de su exposición, los *Individuos* de los tres grupos tienen cierto grado de afectación, ya sea en cuanto a daño basal, o bien en lo que refiere a cinéticas de reparación, por lo que, y tras la elección de un grupo testigo adecuado, sería por demás interesante la ampliación de este estudio, con el fin de eliminar factores de confusión y así poder discernir las probables causas de las alteraciones observadas.

## CONCLUSIONES

- *Aunque las concentraciones de benceno en sangre son significativamente mayores en el grupo de mayor exposición (gasolineros), los diferentes grupos muestreados presentaron índices similares de daño basal, y cinéticas de reparación similares, independientes de su exposición a vapores de gasolina.*
- *Existe una relación múltiple negativa entre el % de reparación del daño inducido al ADN tras 25 minutos y las siguientes variables: edad, años de trabajo, cigarrillos fumados al día, y concentraciones de plomo y benceno en sangre.*
- *Los grupos de gasolineros y trabajadores de la vía pública, en comparación con un testigo histórico, presentan un índice de daño basal significativamente mayor.*
- *Comparados contra un testigo histórico, todos los grupos de exposición se muestran definitivamente afectados en sus cinéticas de reparación.*
- *A pesar de que no existe relación individual entre algún parámetro observado y la cinética de reparación de ningún grupo; en el grupo de baja exposición –el cual no pudo ser considerado como un testigo adecuado- la ingesta de alcohol parece determinante para los resultados de reparación.*
- *Dentro del grupo de gasolineros, existe una diferencia significativa en cuanto a la proporción de daño reparado al comparar el subgrupo de reparación no afectada contra el de reparación afectada o nula.*

## REFERENCIAS

- Ahmed, Farid E. *Toxicology and Human Health Effects Following Exposure to Oxygenated or Reformulated Gasoline*. *Toxicology Letters*. 123, 89-93. 2001.
- Anderson, D.; Hughes, J.A.; Cebulska-Wasilewska, A.; Wierzevska, A. y Kasper, E. *Biological Monitoring of Workers Exposed to Emissions from Petroleum Plants*. *Environmental Health Perspectives*. 104, Supplement 3, 609-613, 1996.
- Anderson, D.; Yu, T.-W. y Schmezer, P. *An Investigation of the DNA-Damaging Ability of Benzene and Its Metabolites in Human Lymphocytes, Using the Comet Assay*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 26, 305-314, 1995.
- Andreolli, C.; Leopardi, P. y Crebelli, R. *Detection of DNA Damage in Human Lymphocytes by Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis after Exposure to Benzene or Benzene Metabolites*. *Mutation Research*. 337, 95-104, 1997.
- Ashley, D.L.; Bonin, M.A.; Cardindali, F.L.; McCraw, J.M.; Holler, J.S.; Needham, L.L. y Paterson, D.G. *Determining Volatile Organic Compounds in Human Blood from a Large Sample Population Using Purge and Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*. 64, 9, 1021-1029, 1992.
- Blasiak, J.; Trzeciak, A.; Malecka-Panas, E.; Drzewoski, J. y Wojewodzka, M. *In vitro Genotoxicity of Ethanol and Acetaldehyde in Human Lymphocytes and the Gastrointestinal Tract Mucosa Cells*. *Toxicology In Vitro*. 14, 4, 287-295, 2000.

- Bogadi-Sare A.; Brumen V.; Turk R.; Karacic V. y Zavalic M. *Genotoxic Effects in Workers Exposed to Benzene: With Special Reference to Exposure Biomarkers and Confounding Factors*. *Industrial Health*. 35, 3, 367-73, 1997.
- Bravo, H.; Roy-Ocotla, G.; Sánchez, P. y Torres, R. *Contaminación Atmosférica por Ozono en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México: Evolución Histórica y Perspectivas*. *Omnia, Revista de la Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM*, 23, 1991.
- Brusick, D. *Principles of Genetic Toxicology*. Second Edition. Plenum Pub. Corp., New York, USA, 1987.
- Carere, A.; Andreoli, C.; Galati, R.; Leopardi, P.; Marcon, F.; Rosati, M.V.; Rossi, S.; Tomei, F.; Verdina, A.; Zijno, A. y Crebelli, R. *Biomonitoring of Exposure to Urban Air Pollutants: Analysis of Sister Chromatid Exchanges and DNA Lesions in Peripheral Lymphocytes of Traffic Policemen*. *Mutation Research*. 518, 215-224, 2002.
- Carere, A.; Antoccia, A.; Cimini, D.; Crebelli, R.; Degrassi, F.; Leopardi, P.; Marcon, F.; Sgura, A.; Tanzarella, C y Zijno, A. *Genetic Effects of Petroleum Fuels. II. Analysis of Chromosome Loss and Hyperploidy in Peripheral Lymphocytes of Gasoline Station Attendants*. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 32, 2, 130-138, 1998.
- DeMarini, D.M.; Lawrence, B.K.; Brooks, H.G. y Houk, V.S. *Compatibility of Organic Solvents with the Microscreen Prophage-Induction Assay: Solvent--Mutagen Interactions*. *Mutation Research*. 263, 2, 107-113, 1991.
- Duker NJ. *Chromosome Breakage Syndromes and Cancer*. *American Journal of Medical Genetics*. 115, 3, 125-129, 2002.

- Egeghy, P.P.; Tornero-Vélez, R. y Rappaport, S.M. *Environmental and Biological Monitoring of Benzene during Self-Service Automobile Refueling*. Environmental Health Perspectives. 108, 12, 1195-1202, 2000.
- Golding BT, y Watson WP. *Possible Mechanisms of Carcinogenesis after Exposure to Benzene*. IARC Science Publications. 150, 75-88, 1999.
- Hadgany, W. y Seemayer, N.H. *Cytotoxic and Genotoxic Effects of Extract of Particle Emission from a Gasoline-Powered Engine*. Environmental and Molecular Mutagenesis. 12, 385-396, 1988.
- Hallberg, L.M.; El Zein, R.; Grossman, L. y Au, W.W. *Measurement of DNA Repair Deficiency in Workers Exposed to Benzene*. Environmental Health Perspectives. 104, Supplement 3, 529-534, 1996.
- Heuser, V.D.; da Silva, J.; Moriske, H.J.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L. y de Freitas, T.R. *Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomys minutus**. Environmental Molecular Mutagenesis. 40, 4, 227-235, 2002.
- Ho, T.-Y. y Witz, G. *Increased Gene Expression in Human Promyeloid Leukemia Cells Exposed to Trans,trans-muconaldehyde, a Hematotoxic Benzene Metabolite*. Carcinogenesis 18, 4, 739-744, 1997.
- Istituto Superiore di Sanità. *Biomonitoring of Human Populations Exposed to Petroleum Fuels with Special Consideration of the Role of Benzene as a Genotoxic Component. Report of the EC Environment, program. Serie Relazioni 97/4*.
- Lewin, Benjamin. *Genes V*. Oxford University Press, Oxford, U.K., 1994.

- Louny, D.J.; Smith-Oliver, T. y Butterworth, B.E. *Assessment of Unscheduled and Replicative DNA Synthesis in Rat Kidney Cells Exposed In Vitro or In Vivo to Unleaded Gasoline*. *Toxicology Applied Pharmacology*. 87, 1, 127-140, 1987.
- Medinsky, M.A.; Kenyon, E.M. y Schlosser, P.M. *Benzene: a Case Study in Parent Chemical and Metabolite Interactions*. *Toxicology*. 105, 225-233, 1995.
- Melham, M.A. *Dangerous and Cancer-causing Properties of Products and Chemicals in the Oil Refining and Petrochemical Industry; Part I. Carcinogenicity of Motor Fuels: Gasoline*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 643, 368-389, 1991.
- National Toxicology Program. *NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Toluene (CAS No.108-88-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies)*. National Toxicology Program Technical Report Series. 371, 1-253, 1990.
- Olive, P.L.; Banath, J.P. y Durand R.E. *Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the "Comet" Assay*. *Radiation Research*. 122, 1, 86-94, 1999.
- Park, S.H. y Schatz, R.A. *Effect of Low-level Short-term O-xylene Inhalation of Benzo[a]pyrene (BaP) Metabolism and BaP-DNA Adduct Formation in Rat Liver and Lung Microsomes*. *Journal of Toxicological and Environmental Health*. 58, 5, 299-312, 1999.
- Pelclova D.; Cerna M.; Pastorkova A.; Urbikova V.; Prochazka B.; Hurychova D.; Dlaskova Z. y Hornychova M. *Study of the Genotoxicity of Toluene*. *Archives of Environmental Health*. 55, 4, 268-273, 2000.

- Petróleos Mexicanos (PEMEX refinación). *Calidad de Combustibles y Proyectos Ambientales*. México, D.F., Petróleos Mexicanos, 1996
- Pitarque, M.; Carbonell, E.; Lapeña, N.; Marsá, M.; Valbuena, A.; Creus, A. y Marcos, R. *SCE Analysis in Peripheral Blood Lymphocytes of a Group of Filling Stations Attendants*. *Mutation Research*. 390, 153-159, 1997.
- Pitarque, M.; Vaglenov, A.; Hirvonen, A. y Norppa, H. *Evaluation of DNA Damage by the Comet Assay in Shoe Workers Exposed to Toluene and other Organic Solvents*. *Mutation Research*. 441, 115-127, 1999.
- Plappert, U.; Barthel, E.; Raddatz, K. y Seidel, H.J. *Early Effects of Benzene Exposure in Mice. Hematological Versus Genotoxic Effects*. *Archives of Toxicology*. *Archives of Toxicology*. 68, 5, 284-290, 1994
- Porru, S.; Placidi, D.; Carta, A.; Gelatti, U.; Ribero, M.L.; Tagger, A.; Boffetta, P. y Donato, F. *Primary Liver Cancer and Occupation in Men: a Case-Control Study in a High-Incidence Area in Northern Italy*. *International Journal of Cancer*. 94, 6, 878-883, 2001.
- Provost, G.S.; Mirsalis, J.C.; Rogers, B.J. y Short, J.M. *Mutagenic Response to Benzene and Tris(2,3-Dibromopropyl)-Phosphate in the Lambda IacI Transgenic Mouse Mutation Assay: A Standardized Approach to In Vivo Mutation Analysis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 28, 342-347, 1996.
- Raabe, G.K. *Review of the Carcinogenic Potential of Gasoline*. *Environmental Health Perspectives*. 101, Supplement 6, 35-38, 1993.
- Reese, E. y Kimbrough, R.D. *Acute Toxicity of Gasoline and Some Additives*, *Environmental Health Perspectives*. 101, Supplement 6, 115-131, 1993.

- Richardson, K.A.; Wilmer, J.L.; Smith-Simpson, D. y Skopek, T.R. *Assessment of the Genotoxic Potential of Unleaded Gasoline and 2,2,4-Trimethylpentane in Human Lymphoblasts In Vitro*. *Toxicology Applied Pharmacology*. 82, 2,316-322, 1986.
- Rojas, E.; Valverde, M.; Sordo, M. y Ostrosky-Wegman, P. *Dna Damage in Exfoliated Buccal Cells of Smokers Assessed by the Single Cell Gel Electrophoresis*. *Mutation Research*. 370, 115-120, 1996.
- Rojas, E; López, M.C. y Valverde, M. *Single Cell Gel Electrophoresis Assay: Methodology and Applications*. *Journal of Chromatography B*. 722, 225-254, 1999.
- Romieu, I.; Ramírez, M.; Meneses, F.; Ashley, D.; Lemire, S.; Colome, S.; Fung, K.; y Hernández-Ávila, M. *Environmental Exposure to Volatile Organic Compounds among Workers in Mexico City, as Assessed by Personal Monitors and Blood Concentrations*. *Archives of Environmental Health*. 107, 7, 511-515, 1999.
- Scherer, G.; Ruppert, T.; Daube, H.; Kossien, I.; Riedel, K.; Tricker, A.R. y Adlkofer, F. *Contribution of Tobacco Smoke to Environmental Benzene Exposure in Germany*. *Environmental International*. 21-26,1995.
- SEMARNAP. *Lo Que Usted Debe Saber Sobre el Plomo. Serie Plomo No. 1*. Edigraf Watson-Gómez, S.C. 1996.
- Singh, N.P. y Khan, A. *Acetaldehyde: Genotoxicity and Cytotoxicity in Human Lymphocytes*. *Mutation Research*. 337, 1, 9-17, 1995.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. y Schneider, E.L. *A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells*. *Experimental Cell Research*. 175, 1, 184-191, 1988.



- Slupphaug, G.; Lettrem, I.; Myrnes, B. y Krokan, H.E. *Expression of O6-methylguanine-DNA Methyltransferase and Uracyl-DNA Glycosylase in Human Placentae from Smokers and Non-smokers*. *Carcinogenesis*. 13, 10, 1769-1773, 1992.
- Smith, M.T.; Zhang, L.; Wang, Y.; Hayes, R.B.; Li, G.; Wielmens, J.; Dosemeci, M.; Titenko-Holland, N.; Xi, L.; Kolachana, P.; Yin, S. y Rothman, N. *Increased Translocations and Aneusomy in Chromosomes 8 and 21 Among Workers Exposed to Benzene*. *Cancer Research*. 58, 2176-2181, 1998.
- Stark, A. y Rastetter, W.H. *Structure-Activity Relationships in the Mutagenicity and Cytotoxicity of Putative Metabolites and Related Analogs of Benzene Derived from the Valence Tautomers Benzene Oxide and Oxepin*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 28, 284-293, 1996.
- Sul, D.; Lee, D.; Im, H.; Oh, E.; Kim, J. y Lee, E. *Single Strand Breaks in T- and B-Lymphocytes and Granulocytes in Workers Exposed to Benzene*. *Toxicology Letters*. 134, 87-95, 2002.
- Surrallés, J.; Sutio, K.; Nylund, L.; Järventaus, H.; Norppa, H.; Veeidebaum, T.; Sorsa M. y Peltonen, K. *Molecular Cytogenetic Analysis of Buccal Cells and Lymphocytes from Benzene-exposed Workers*. *Carcinogenesis*. 18, 4, 817-823, 1997.
- *The Merck Index*. 13<sup>th</sup> edition. O'Neil, M.J. (senior editor). Merck & CO. Inc., Whitehouse Station, NJ. 1996.
- Tice, R.R. y Strauss, G.H. *The Single Cell Gel Electrophoresis / Comet Assay: a Potential Tool for Detecting Radiation-Induced DNA Damage in Humans*. *Stem Cells*. 13 Supplements 1, 207-214, 1995. Review.

- Tsutsui, T.; Hayashi, N.; Maizumi, H.; Huff, J. y Barrett, J.C. *Benzene-, Catechol-, Hydroquinone- and Phenol-induced Cell Transformation, Gene Mutations, Chromosome Aberrations, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and Unscheduled DNA Synthesis in Syrian Hamster Embryo Cells*. Mutation Research. 373, 113-123, 1997.
- Tuo, J.; Loft, S.; Thomsen M.S. y Poulsen, H.E. *Benzene-Induced Genotoxicity in Mice In Vivo Detected by the Alkaline Comet Assay: Reduction by CYP2E1 Inhibition*. Mutation Research. 5, 368 (3-4), 213-291, 1996.
- Wieland, P. y Lauterburg, B.H. *Oxidation of Mitochondrial Proteins and DNA Following Administration of Ethanol*. Biochemical Biophysics Research Community. 24, 213, 3, 815-819, 1995.
- Woolard, D.; Franks, R.; Sampson, D. y Smith, D.R. *A Method for Lead Concentration and Isotopic Abundance Analyses by Inductively Coupled Plasma-Magnetic Sector Mass Spectrometry*. Fundamentals of Applied Toxicology. 36-54, 1997.
- [www.aromaticsonline.net](http://www.aromaticsonline.net)
- [www.energia.gob.mx](http://www.energia.gob.mx)
- [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)
- [www.ine.gob.mx](http://www.ine.gob.mx)
- [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- [www.rae.es](http://www.rae.es)
- [www.sma.df.gob.mx](http://www.sma.df.gob.mx)
- [www.who.int](http://www.who.int)

- Yuan, D.; Zhou, W. y Ye, S. *Effect of Leaded and Unleaded Gasoline on the Mutagenicity of Vehicle Exhaust Particulate Matter*. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 19, 1-2, 41-48, 2000.
- Zarani, F.; Papazafiri, P. y Kappas A. *Induction of Micronuclei in Human Lymphocytes by Organic Solvents In Vitro*. Environmental Pathology Toxicology and Oncology. 18, 1, 21-28, 1999.