

# **Determinación de los Efectos Genotóxicos y Epigenéticos del plomo en Personas expuestas en el Reciclaje de Baterías.**

**Presentado por Andres Hernandez  
como requisito de grado para el título de Magister en Ciencias Biológicas.**

**Directora: Helena Groot de Restrepo**

**Co-directores: Diana Narváez Noguera y Valeriano López Segura**

## **Resumen**

El daño oxidativo generado por el plomo ha sido señalado como una fuente de daño genotóxico al ADN. Éste efecto oxidativo transforma los nucleótidos a sus formas oxidadas como 8-oxoguanina u otras moléculas. Al mismo tiempo el plomo ha sido reportado como un agente inhibidor de la enzima APE1 responsable directa de la reparación por escisión de bases y relacionada con la eliminación de 5-hmC. Esta investigación fue diseñada con el fin de evaluar el efecto oxidativo indirecto del plomo sobre el ADN y relacionarlo con la posible desmetilación del DNA causada por daño oxidativo. Para esto se analizaron dos grupos de 30 personas. Un grupo fue compuesto por trabajadores de fábricas de reciclaje de baterías acido-plomo, el otro fue utilizado como grupo control sin exposición a plomo. Junto a los estudios moleculares, se realizaron encuestas sobre estilo de vida y otras variables relacionadas con daño al ADN. Todas las muestras fueron recogidas tras la firma del consentimiento informado. A las muestras de sangre se les cuantificaron los niveles de ~~plomo~~ plomo, el porcentaje de daño mediante la prueba del cometa y los niveles de hidroximetilación del DNA. Los resultados de esta investigación indican que los individuos expuestos en tareas de reciclaje de baterías tienen concentraciones altas de plomo en sangre, también se evidencia una relación dosis dependiente entre el daño al ADN y el plomo. No se observaron diferencias para los niveles de 5-hmC entre el grupo control y el expuesto.

~~Finalmente, no se evidencio Se observó la ausencia de~~ relación entre la exposición a plomo y los niveles de hidroximetilacion del ADN.

## **Introducción**

El plomo ha sido utilizado por el hombre desde la industrialización debido a su maleabilidad, conductividad y resistencia a la corrosión. Estas cualidades fisicoquímicas hacen que éste se utilice en la manufactura de una gran cantidad de productos industriales dentro de los cuales se destacan la producción de pinturas, combustibles, y baterías (Olewińska et al., 2010). La amplia distribución ambiental de productos con plomo genera las condiciones para que éstos entren en contacto con el cuerpo humano. Dentro del individuo, estos compuestos se dirigen a la sangre y se almacenan en el tejido óseo hasta que se cumple el respectivo tiempo de recambio celular (Rabinowitz et al., 1976).

Los países involucrados en la producción de plomo y sus subproductos industriales están clasificados en dos grandes grupos: los productores primarios que obtienen este material directamente de la minería y los productores secundarios que funden, purifican y reciclan el metal, con el fin de manufacturar nuevamente productos derivados del plomo (IARC, 2006). En Colombia, aunque se da la producción primaria de plomo, la mayor fuente de exposición al plomo son las plantas artesanales de reciclaje de baterías acido-plomo. Estas plantas toman las baterías que han terminado su ciclo funcional, las desarman para tomar el plomo que está en su interior y luego lo funden para crear placas que posteriormente se utilizan en el ensamblaje de baterías nuevas (Were et al., 2012). En estas recicladoras de plomo se da un contacto directo de los trabajadores con el metal en distintos estados, factor que dispara la acumulación de plomo en distintos tejidos haciendo, en algunos casos, que las concentraciones de plomo en sangre de estos operarios puedan llegar a concentraciones mayores a 81  $\mu\text{g}/\text{dl}$  un valor muy por encima de los 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$  establecidos por la normativa internacional como valores máximos permitidos (OSHA, 2007).

Con el tiempo y la consecuente exposición del hombre a este tipo de contaminación industrial se han encontrado diversos efectos tóxicos, dentro de los cuales se pueden encontrar encefalopatías, daño renal, anemia y toxicidad del sistema reproductivo (Johnson., 1998). Adicionalmente, o como causa primaria de estos efectos tóxicos, se ha encontrado que la exposición a plomo genera daño de cadena sencilla en el ADN mediante mecanismos indirectos, indicando un efecto co-mutagénico principalmente en presencia de otros agentes genotóxicos (Groot de Restrepo et al., 2000).

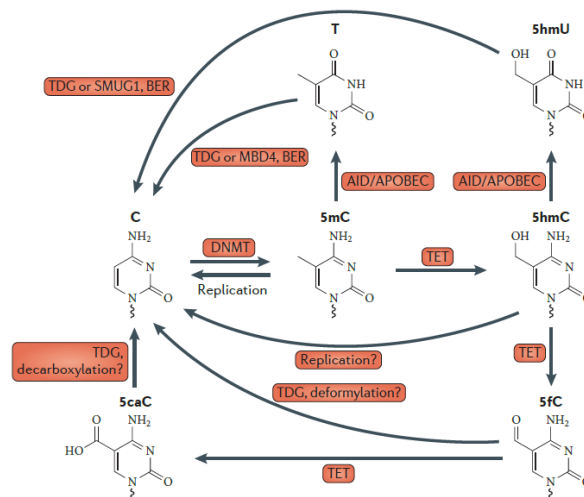
Muchos autores han reportado daño genómico en organismos expuestos a acetato de plomo, plomo elemental y moléculas no orgánicas asociadas a plomo (Garcia-Leston et al., 2010). La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, 2006) ha encontrado evidencia suficiente para incluir el plomo en el grupo 2B clasificándolo como “posible agente carcinogénico en humanos” basado principalmente en estudios de la incidencia de cáncer en modelos animales. Sin embargo, la ausencia de estudios concluyentes respecto a sus efectos carcinogénicos en humanos hacen que éste no cambie su clasificación actual a una que represente su verdadero efecto genotóxico (IARC, 2006).

Distintos autores han estudiado desde diferentes enfoques el posible efecto genotóxico indirecto del plomo, encontrando mecanismos puntuales mediante los cuales el plomo afecta indirectamente al ADN. Dentro de las investigaciones más relevantes sobre el tema se encuentra el trabajo realizado por McNeill y colaboradores (2007) en el cual se encontró el efecto inhibitorio que tiene el plomo sobre la enzima endonucleasa apurinica/apirimidimica 1 (APE 1), que participa en el sistema de reparación por escisión de bases (BER). Esta enzima ejerce una acción de tipo endonucleasa 3'-5' en nucleótidos previamente reconocidos a los que se les ha escindido su base nitrogenada. Esta inhibición causa la acumulación de sectores abásicos que son responsables del daño en el ADN (McNeill et al., 2007).

Otro mecanismo implicado en el daño del ADN por la exposición a plomo es la disminución de la disponibilidad de grupos glutatión. Respecto a este mecanismo se ha encontrado que el plomo secuestra a estos péptidos participantes en los

procesos de neutralización de agentes oxidantes. En condiciones normales los grupos glutatión se encargan de neutralizar moléculas oxidantes como los peróxidos y los radicales hidroxilo disminuyendo los niveles celulares de estrés oxidativo (Silbergeld et al., 2000).

La metilación del DNA ha sido en los últimos años un mecanismo de control génico muy estudiado. De este modo, se sabe que la metilación de promotores se asocia con silenciamiento génico. Sin embargo, a pesar de lo estudiado en el proceso de metilación, es poco lo conocido en el proceso de desmetilación. En la actualidad se han descrito dos mecanismos que pueden estar implicados en el sistema de desmetilación general del ADN. Por un lado puede existir un proceso de falta de mantenimiento de la metilación por falta de función de la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), que puede estar mediado por una falta de reconocimiento por parte de DNMT1 de los sitios hidroximetilados, generando tras la división celular una paulatina pérdida de metilación (Valinluck et al., 2007). Por otro lado, el descubrimiento en los últimos años de la familia de enzimas Ten Eleven Translocation (TET) (Tahiliani et al., 2009), ha abierto la posibilidad de una desmetilación activa. Estas enzimas catalizan la reacción de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina la cual está ligada a procesos de pérdida de metilación y transición de heterocromatina a eucromatina (Figura 1) (Sheng y Zhang., 2013). En este proceso el sistema de reparación BER identifica y cambia las 5-hmC producidas por el proceso oxidativo a citosinas sin metilar (Guo et al., 2011).



## **Figura 1, Proceso de desmetilacion del ADN (Branco et al.,2012**

Aunque se ha comprobado que la mayor fuente de 5-hmC en el ADN es a causa de las enzimas TET, se ha demostrado que algunas condiciones de radiación o altas concentraciones de estrés oxidativo pueden desencadenar procesos oxidativos que desembocan en la presencia de 5-hmC (Burdzy et al., 2002; Cadet y Wagner, 2006; Zuo et al., 1995). De este modo la exposición a plomo podría ser la desencadenante de este proceso oxidativo que resulte en la desmetilación global del ADN.

A este respecto, existen estudios que relacionan la exposición a plomo con cambios epigeneticos. Pilsner et al. (2009) y Wright et al. (2010) han encontrado una relación entre la exposición a plomo y una disminución generalizada en los niveles de metilación en secuencias repetitivas del ADN, indicando un desbalance en los niveles de metilación globales. Análogamente, el plomo ha sido descrito como causante de estrés oxidativo en las células mediante reacciones tipo Fenton. Reacciones que han sido reportadas como productoras del cambio de 5-metilcitosina (5-mC) a 5 hidroximetilcitosina (5-hmC ) (Masuda et al.,1975). Establecida esta relación, el objetivo de esta investigación es el evaluar el efecto indirecto del plomo en el daño al ADN y con la presencia de 5-hmC como un posible efector de desregulación génica.

### **Métodos**

-Población de estudio y toma de muestras

La población analizada en este estudio de monitorización transversal incluyó un total de 60 personas, divididos en dos grupos. El primer grupo denominado grupo de estudio, conformado por 30 trabajadores expuestos ocupacionalmente a plomo en fábricas artesanales de baterías; y un segundo grupo de 30 participantes denominado grupo control conformado por individuos sin exposición conocida a plomo, ambos grupos de participantes fueron tomados en la zona de Bogotá y

Soacha, Colombia. Las personas en el grupo expuesto y control fueron apareadas por edad y sexo.

La determinación del tamaño de la muestra se realizó mediante la metodología de diferencias estándar descrita por Whitley y Ball (2002). El cálculo se basó en el efecto genotóxico del plomo en el ADN mediante la técnica del Cometa alcalino, para esto se utilizaron estudios previos en empresas dedicadas al almacenamiento y manufactura de baterías (Palus et al., 2003; Danadevi et al., 2003 ; Chen et al., 2006 ; Shaik & Jamil et al., 2009). Esta muestra tiene un poder descriptivo del 95% basado en un nivel de significancia de 0.05 (Whitley & Ball, 2002).

A cada individuo se le tomó una muestra de sangre mediante venopunción, de 15 ml alicuotada en 2 tubos heparinizados de 5ml y un tubo con EDTA de 5 ml. Como requisito previo a la toma de muestras, los participantes completaron una encuesta con información general sobre edad, estilo de vida e historial médico y ocupacional con el fin de recolectar información relevante para el estudio; también se les notificó mediante un consentimiento informado los alcances y riesgos del presente estudio. Los criterios de inclusión para participar en el estudio fueron: Ser Adulto mayor de 18 años, no tener exposición reciente (6 meses) a rayos-X y cumplir con un periodo de exposición acumulada de no menos de 6 meses en el caso de grupo expuesto.

-Determinación de los niveles de plomo en sangre.

La determinación de la concentración de plomo en sangre se realizó a partir de una alícuota de sangre heparinizada, este análisis se realizó en el Instituto Nacional de Salud mediante el método de voltamperometría de redisolución anódica la cual cuenta con un rango de detección de entre 3.3 a 65 ng/100ml (LeadCare II, USA),.

-Técnica del cometa alcalino.

Para determinar el daño en el ADN se realizó la técnica del cometa alcalino según el método modificado descrito por Singh et al., (1988). Esta técnica permite cuantificar el daño de cadena sencilla mediante la migración espacial del ADN dañado en un campo eléctrico. Del tubo de sangre heparinizado se tomó una

alícuota de sangre de 30µl la cual se diluyó en una proporción del 50% en PBS sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ , posteriormente esta mezcla se diluyó en agarosa de bajo punto de fusión para llegar a una concentración del 6,25%. Se elaboraron las láminas de electroforesis de dos capas y se realizó la electroforesis alcalina (pH >13). A continuación se realizó el proceso de tinción del ADN mediante la inmersión de las láminas en una solución de Gelgreen a una concentración de 3X (Biotium, USA).

Como control positivo de daño al ADN se tomó una muestra de 100µl de sangre total de un individuo no expuesto y se mezcló con 100µl de Etilmetanosulfonato 3mM, esta mezcla se incubó en 2 horas a 37°C a una concentración de  $\text{CO}_2$  del 5%. Se procedió a realizar un lavado con 100 µl de medio RPMI y el precipitado se resuspendió en 100µl de RPMI. A estas células se les aplicó el protocolo del cometa descrito anteriormente.

En el proceso de lectura se analizaron 100 células distribuidas en 2 réplicas mediante microscopía de fluorescencia a un aumento de 400X a su vez se utilizó un filtro de 510 nm (Zeiss, Alemania), el análisis del daño al ADN se llevó a cabo con el software CASP ver 1.2.3.b1 (Casplab, Polonia) con los siguientes parámetros: Head center threshold: 0.8, Comet threshold: 0.05 y un perfil de cuantificación del ADN sin agrupamiento de cola. Los valores de estimación de daño al ADN fueron determinados según el porcentaje de ADN presente en la cola y la longitud de la misma; la longitud del cometa se determinó con fines netamente comparativos.

#### -Cuantificación de los niveles de hidroximetilación del ADN

Para el proceso de cuantificación de los niveles de hidroximetilación se procedió a realizar la extracción del ADN de células sanguíneas periféricas mediante el kit de precipitación salina DNA2000 (Corpogen, Colombia). Después se cuantificó por triplicado la concentración de ADN mediante espectrofotometría ultravioleta en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, se realizaron diluciones del ADN a una concentración de 25 ng/µl. Para la cuantificación de los niveles de 5-hidroximetilcitosina en el ADN se utilizó el kit de ELISA Quest 5-hmC (Zymo research, USA) el cual se basa en la detección de la

base 5-hmC mediante el uso de anticuerpos policlonales en un ensayo tipo sándwich.

Durante el protocolo de la prueba de ELISA se realizó el bloqueo (2ng/μl) y cubrimiento de la microplaca con los anticuerpos anti-hmC (1mg/ml). Posteriormente se efectuó el ligamiento de 50 ng de ADN a la placa y se adicionó el anticuerpo revelador anti-ADN (1X). Finalmente se reveló mediante la adición de la solución reveladora la cual se dejó incubar durante una hora a 37°C.

Paralelamente al montaje del ADN problema, se dispuso ADN hidroximetilado en diferentes proporciones (0%, 0.03%, 0.12%,0.23%,0.55%) con el fin de construir una curva de calibración. Para la lectura de la respuesta colorimétrica, se utilizó un lector de microplacas modelo 680 (Biorad,USA) para leer la respuesta colorimétrica del ensayo a una longitud de onda de 415nm. Los resultados fueron extrapolados en la ecuación de la recta obtenida mediante la curva de calibración con el fin de obtener el porcentaje de hidroximetilación en cada individuo.

#### -Perfil Sintomatológico.

Dentro de las encuestas de estilo de vida se indagó la autopercepción de 27 síntomas relacionados con la exposición a plomo (Anexo 2). Debido al elevado número de síntomas y a la poca especificidad de estos, se procedió a elaborar un puntaje acumulado de sintomatología en el cual a cada uno de los síntomas se le otorgó un puntaje de 1 para conseguir un rango de 0 a 27, donde 0 es ausencia total de síntomas y 27 representa un cuadro acertado de intoxicación por plomo.

#### -Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS 16 (SPSS inc, USA). La determinación de la normalidad de los datos se realizó mediante la elaboración de gráficos Q-Q y pruebas de normalidad Shapiro-Wilk.



Para la comparación de los grupos expuesto y control en los ensayos del cometa, se realizaron pruebas U de Mann-Whitney para muestras independientes e iteraciones bajo el método de Montecarlo, en estas últimas se realizaron 1'000.000 iteraciones con un nivel de significancia del 0.01. Para establecer las diferencias entre los controles positivos y los grupos de estudio se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. En contraste, las comparaciones de los grupos control-expuesto para los niveles de hidroximetilación del ADN y la concentración de plomo en sangre se realizaron mediante la prueba t de Student. Se realizó una prueba de ANOVA con análisis de Dunnet, para la evaluación del efecto de la concentración de plomo en sangre de acuerdo con las diferentes ocupaciones de los individuos en el grupo expuesto comparados con el grupo no expuesto.

Se utilizó el análisis de Regresión Lineal Múltiple (RLM) para determinar la asociación entre el daño en el ADN y la hidroximetilación con los niveles de plomo, la labor que se desempeña en el grupo de expuestos, el cuadro clínico, el consumo de cigarrillo y licor. El nivel de significancia se midió con valores de  $p < 0.05$ .

## Resultados

### -Descripción de la muestra

Tanto el grupo control como el grupo de personas expuestas a plomo están compuestos por 21 hombres y 9 mujeres que se encuentran en un rango de edad de 24 a 63 años y 22 a 63 años respectivamente. La proporción de individuos que fuman y consumen licor es similar para los dos grupos. Con respecto a la edad, se escogieron individuos dentro del mismo rango de edad, y cada pareja de individuos tiene como máximo una desviación de 3 años según su par expuesto (Tabla 1).

El grupo expuesto puede dividirse en siete categorías según el oficio ejercido dentro del proceso de reciclaje de baterías ácido-plomo. De acuerdo con esto, se puede observar que la mayoría de trabajadores (40%) trabaja en la elaboración de rejillas/placas de plomo (Tabla 1).

**Tabla1**, Características demográficas y ocupacionales de la muestra (N=60).

	Subgrupo	Expuesto N(%)	Control N(%)
<b>Sexo</b>	Femenino	9 (30)	9 (30)
	Masculino	21 (70)	21 (70)
<b>de tabaco</b>	Si	3 (10)	5 (16.7)
	No	27 (90)	25 (83.3)
<b>Consumo de licor</b>	Si	22 (73.3)	22 (73.3)
	No	8 (26.7)	8 (26.7)
<b>Edad</b>	20-29	6 (20)	8 (26.7)
	30-39	13 (43.3)	11 (36.6)
	40-49	7 (23.3)	7 (23.3)
	50-59	2 (6.7)	2 (6.7)
	60-69	2 (6.7)	2 (6.7)
<b>Labor de exposición</b>	Elaboración de rejillas/placas	12 (40)	No aplica
	Fundición/reciclaje de baterías	6 (20)	
	Fabricación de baterías/ensamblaje	1 (3.3)	
	Manipulación de baterías	1 (3.3)	
	Administrativos	8 (26.7)	
	Descargador	1 (3.3)	
	Soldador	1 (3.3)	

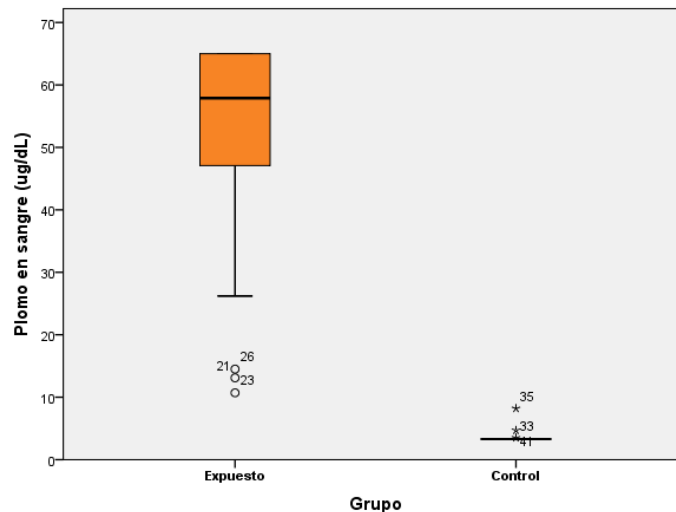
-Análisis de plomo en sangre.

Los niveles de plomo en sangre resultaron diferir significativamente entre el grupo expuesto a plomo y el grupo control (Tabla 2 y Figura 1), encontrando un aumento de 47.58  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en las concentraciones de plomo en sangre del grupo expuesto. A su vez las medias de los grupos fueron 17.05  $\mu\text{g}/\text{dl}$  para el grupo expuesto y 0.92  $\mu\text{g}/\text{dl}$  para el grupo control. Los niveles de plomo en el grupo expuesto indican una exposición catorce veces mayor respecto al grupo control. Previó al análisis de significancia se determinó la normalidad de los datos (Anexo 1).

**Tabla 2**, Resumen de los análisis estadísticos para las variables concentración de plomo, porcentaje de 5-hmC y daño al ADN (porcentaje y longitud)

Grupo	Plomo en sangre (Media $\pm$ DE)	p*	% de 5-hmC	p*	% de daño (Mediana $\pm$ DE)	p**	p***	Longitud ( $\mu\text{m}$ ) (Mediana $\pm$ DE)	p**	p***
Expuestos (n=30)	51.10 $\pm$ 17.05	< 0.01	0.25 $\pm$ 0.13	0.61	3.27 $\pm$ 6.41	0.012	0.06	313.86 $\pm$ 139.37	0.344	0.350
No expuestos (n=30)	3.52 $\pm$ 5.76		0.24 $\pm$ 0.1		14.08 $\pm$ 14.05			360.11 $\pm$ 142.92		

\* : Según la prueba t-Student ,  $\alpha/2 = 0.025$   
 \*\* Según la prueba de Mann-Whitney,  $\alpha/2 = 0.025$   
 \*\*\*: Según prueba de Montecarlo (1'000.000 de iteraciones),  $\alpha : 0.01$



**Figura 2**, Diferencias en las concentraciones de plomo para los grupos control y expuesto.

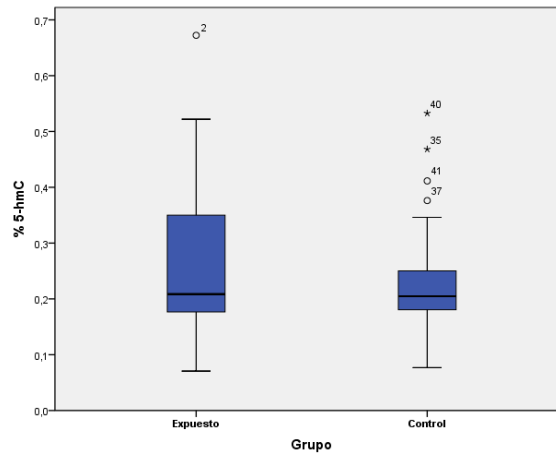
El análisis estadístico de las variables de estudio mediante la prueba de ANOVA-Dunnet, demostró que existen diferencias significativas para la concentración de plomo según la ocupación desempeñada (Tabla 3). Es de esperar que estas diferencias sean entre el grupo de no expuestos y cada uno de los grupos de expuestos a plomo.

**Tabla 3**, Diferencias en la concentración de plomo en sangre de los diferentes oficios frente al grupo no expuesto ( $\mu\text{g/dl}$ ) según ANOVA-Dunnet.

Ocupación	Plomo en sangre (Media $\pm$ DE)	P
<b>Oficio de no exposición</b>	3.52 $\pm$ 0.92	< 0,001
<b>Elaboración de rejillas/Placas</b>	47.57 $\pm$ 17.58	
<b>Fundición/Reciclaje de Baterías</b>	60.88 $\pm$ 5,96	
<b>Fabricación de Baterías/Ensamblaje</b>	47.10	
<b>Manipulación de Baterías</b>	65.00	
<b>Administrativos</b>	44.32 $\pm$ 21,27	
<b>Descargador</b>	65.00	
<b>Soldador</b>	65.00	

-Medición del porcentaje de ADN hidroximetilado

La prueba U realizada a los porcentajes de 5-hmC indicó la ausencia de diferencias significativas en el porcentaje de 5-hmC entre los individuos del grupo expuesto y los individuos del grupo control (Tabla 3 y Figura 3), también se puede evidenciar que el grupo expuesto tiene una mayor desviación estándar respecto al grupo control (Tabla 2).

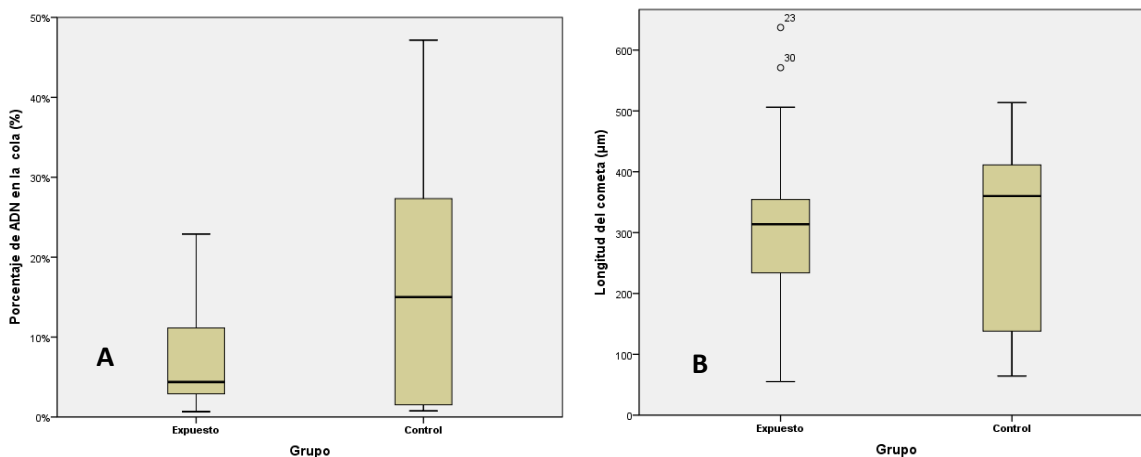


**Figura 3.** Diferencias entre grupos en el porcentaje de 5-hmC .

-Medición de daño al ADN mediante la prueba del cometa alcalino.

El daño al ADN fue determinado mediante dos valores. El primero denominado porcentaje de ADN en la cola del cometa, indicó una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo expuesto con unos valores de p de 0.012 y 0.006 según las pruebas de Mann-Whitney y de Montecarlo (con  $10^6$  iteraciones) respectivamente (Tabla 2 y Figura 4).

Con el segundo parámetro de daño, denominado longitud de la cola, no se observaron diferencias significativas entre las medianas de los grupos del ensayo y solo fue calculado con fines comparativos (Tabla 2 y Figura 4A). Adicionalmente los resultados del control de daño con Etilmetanosulfonato 3mM presentaron valores más altos tanto en la longitud, como en el porcentaje de ADN (Figura 4B). Adicionalmente los datos de los controles positivos indicaron un mayor porcentaje de ADN en la cola respecto a los grupos del ensayo, por el contrario no se observaron diferencias frente al control positivo en la longitud (Anexo 3).



**Figura 4.** Diferencias en los indicadores de daño al ADN (A) Según porcentaje de ADN en la cola del cometa (B), según la longitud del cometa.

#### -Efecto de los factores de confusión

El análisis de RLM para los dos parámetros de daño en el ADN y para los niveles de hidroximetilación en el ADN no mostraron asociación significativa con los niveles de plomo, la ocupación, el cuadro clínico, el consumo de cigarrillo o con el licor ( $p > 0.05$ ). Solamente se ve significancia cuando se comparan el porcentaje de ADN en la cola del Cometa y la concentración de Plomo en sangre, En este caso se observó una asociación significativa en la que a medida que aumenta la concentración en 1  $\mu\text{g}/\text{dl}$  el porcentaje disminuye en 0,16 unidades ( $R = 0.13$ ,  $\text{Coef} = - 0.16$ ,  $p = 0.05$ ) indicando que el plomo ejerce un efecto negativo en el porcentaje de ADN en la cola del cometa.

#### Discusión de resultados

El análisis de plomo en sangre del grupo expuesto confirmó que los niveles de los trabajadores son aproximadamente 14 veces más elevados que los niveles de plomo de personas sin exposición ocupacional conocida. Es interesante resaltar que los valores en el grupo expuesto se encuentran por encima de los 40-50  $\mu\text{g}/\text{dl}$  indicados por la comunidad internacional como aceptables (OSHA, 2007). También sobresale el hecho de que el 33.3% de los casos presentan concentraciones cercanas a 70  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (debido a que el límite de detección de la prueba es de 65  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ),

valor relacionado con casos de intoxicación aguda por plomo. En individuos expuestos a estas concentraciones se han documentado fuertes alteraciones sistémicas como el aumento en los niveles de zinc protoporfirina, la presencia de anemia plúmbica o desarrollo de trastornos neurológicos (Gonzales y Rojas, 2008); sugiriendo la presencia de fuertes alteraciones en diversos sistemas. De esta forma, los datos son coherentes con la sintomatología reportada por los encuestados, en donde se puede observar que 14 individuos expuestos presentan más de 5 síntomas de intoxicación por plomo, mientras que solo 2 controles superan este umbral (Anexo 2)

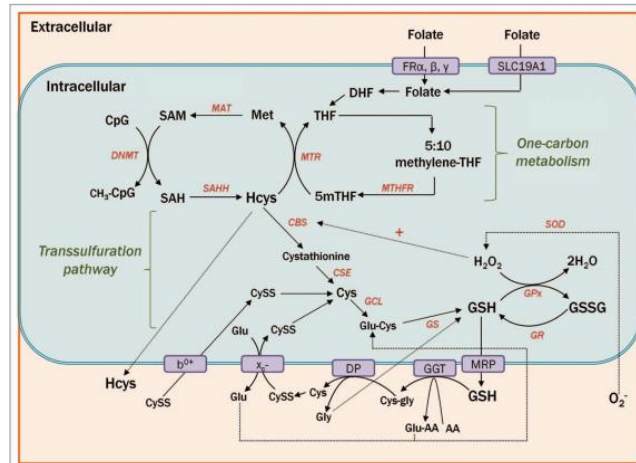
Al analizar los datos de genotóxicidad se pudo establecer que, contrario a los resultados vistos en estudios previos, hay un mayor nivel de daño en los individuos del grupo control que en los individuos expuestos ocupacionalmente a plomo (Grott de Restrepo et al., 2000; Palus et al., 2003; Chen et al., 2006). Este resultado atípico es contradictorio a las predicciones iniciales, ya que múltiples investigaciones indican un leve efecto genotóxico del plomo (Garcia-Leston et al., 2010) . Por el contrario, los resultados de los valores de longitud de la cola no presentan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo expuesto. La posible explicación de estos resultados es atribuida a la gran desviación estándar de los datos (Tabla 2) la cual puede ser debida a variables no tenidas en cuenta como ejercicio, estados infecciosos o contaminación, que pueden tener efectos importantes en el nivel de daño al ADN (Møller et al., 2000). Otra hipótesis que explica estos resultados es la adaptación de los individuos a niveles elevados de oxidación durante los primeros 6 meses de exposición ocupacional. Esta exposición podría haber aumentado la producción de grupos glutatión que neutralizarían los radicales libres producidos por el plomo (Kasperczyk et al., 2004). Dentro de esta hipótesis es importante destacar la función de la enzima APE1, que tiene inhibida su actividad endonucleasa en presencia de plomo, aumentando los sitios abasicos/apurínicos por falta de reparación. Paralela a esta función, APE1 posee actividad inductora transcripcional activando múltiples genes (AP-1, NF- $\kappa$ B , Myb , PEBP2, HLF , NF-Y , Egr-1, HIF-1  $\alpha$  y la Familia ATF/CREB), e induciendo indirectamente la producción del tripeptido glutatión determinante en la eliminación de plomo del cuerpo y en la

eliminación de especies reactivas de oxígeno (Tell et al.,2009). En conclusión se podría establecer que la exposición a plomo generaría un estado de protección aumentada frente al daño por especies reactivas del oxígeno (Fowler et al., 2004) pero una susceptibilidad al daño causado por agentes genotóxicos adicionales (Groot et al., 2000), aunque hace falta comprobar los resultados en una muestra de individuos más grande.

Los resultados del análisis de cuantificación de 5-hmC no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los individuos expuestos y los controles. Esta hipótesis es apoyada por efecto regulatorio que ejerce APE1 sobre las especies reactivas del oxígeno (Tell et al.,2009). Sin embargo, y basándonos en nuestra hipótesis de partida, lo más lógico sería pensar que el efecto del plomo estaría provocando una rápida desmetilación y por tanto el paso intermedio de hidroximetilación no resulta evidente. Por esta razón es necesario completar el estudio midiendo los niveles de metilación global en los que esperamos se observe una disminución provocada por el plomo.

También es importante afirmar que en presencia de plomo el tripeptido glutatión no se recicla de forma normal, generando la producción de nuevos tripeptidos que pueden causar la disminución de donadores de grupos metilo involucrados en el ciclo del folato. Este hecho apoya la existencia de un proceso de desmetilación mediado por el desbalance en el ciclo del folato o mediante la desregulación enzimática de mecanismos redox (Niedzwiecki et al., 2013). Este ciclo basado en el reciclaje celular de s-adenosil homocisteína (SAM) puede competir con el proceso de síntesis de grupos glutatión mediante el uso compartido de cisteína, molécula que por medio de su grupo funcional tiol genera el proceso de metilación del ADN (Figura 5).





**Figura 5.** Síntesis de grupos glutatión. (Tomado de Niedzwiecki et al., 2013)

Finalmente se puede decir que la única variable con poder explicativo sobre el efecto genotóxico del plomo en el ADN es la concentración de plomo en sangre ( $r = 0.13$ ), indicando que el poder explicativo de las variables del estudio puede estar afectado por eventos o características biológicas no tomados en cuenta en este ensayo.

En conclusión se puede afirmar que el efecto genotóxico del plomo en el ADN es de carácter multifactorial, con una clara tendencia a ser dosis dependiente, por otro lado el efecto del plomo en los niveles de 5-hmC no se encuentra directamente relacionado sugiriendo otras posibles vías en el proceso de desmetilación o indicando una reestructuración del modelo experimental mediante la medición de metilcitosina.

Se propone para futuros ensayos el integrar más variables de estilo de vida que puedan explicar el daño en el ADN, también sería muy explicativo el incorporar ensayos de cuantificación de especies reactivas del oxígeno y ensayos de cuantificación de  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine (grupo glutatión). Como medida adicional también se podría cuantificar los niveles de otros productos de oxidación del ADN como es la 8 oxoguanina, indicada como un indicador primario de daño al ADN.

Respecto a las implicaciones ocupacionales, podemos resumir que aunque la acción del plomo no presenta un efecto genotóxico evidente en la muestra analizada, son necesarios estudios a mayor profundidad con el fin de desenmascarar el posible efecto que tiene el estrés oxidativo y el desbalance en el sistema de metilación en el ADN de los individuos afectados. A su vez, como medida cautelar se recomienda la aplicación de controles ocupacionales internacionales. Según la normatividad internacional (España, Estados Unidos, Comunidad Europea, Organización Mundial de Salud) los niveles de plomo en sangre no deben exceder en el más estricto de los casos los 30 µg/ en 100 ml de sangre debido al posible desarrollo de efectos negativos para el individuo como efectos neurocomportamentales y hematológicos (González y Rojas, 2008).

Debido al posible impacto de estas medidas en el sector informal del reciclaje de baterías, es importante el articular las medidas punitivas con acciones de tipo pedagógico, correctivo y económico que faciliten el proceso de implementación. Dentro de estas medidas se ha encontrado que los planes de vigilancia, de capacitación en el uso de elementos de protección personal y de auto cuidado son de suma importancia en el control de este tipo de exposición (González y Rojas, 2008).

### **Bibliografía**

- Branco, M. R., Ficz, G., & Reik, W. (2012). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature reviews. Genetics*, 13(1), 7–13. doi:10.1038/nrg3080.
- Burdzy, A., Noyes, K. T., Valinluck, V., & Sowers, L. C. (2002). Synthesis of stable-isotope enriched 5-methylpyrimidines and their use as probes of base reactivity in DNA. *Nucleic Acids Res*, 30(18), 4068-4074.

- Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2). doi: 10.1101/cshperspect.a012559
- Chen, Z., Lou, J., Chen, S., Zheng, W., Wu, W., Jin, L., . . . He, J. (2006). Evaluating the genotoxic effects of workers exposed to lead using micronucleus assay, comet assay and TCR gene mutation test. *Toxicology*, 223(3), 219-226. doi: 10.1016/j.tox.2006.03.016
- Danadevi, K., Rozati, R., Saleha Banu, B., Hanumanth Rao, P., & Grover, P. (2003). DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology*, 187(2-3), 183-193.
- Fowler, B. A., Whittaker, M. H., Lipsky, M., Wang, G., & Chen, X. Q. (2004). Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals*, 17(5), 567-568.
- Garcia-Leston, J., Mendez, J., Pasaro, E., & Laffon, B. (2010). Genotoxic effects of lead: an updated review. *Environ Int*, 36(6), 623-636. doi: 10.1016/j.envint.2010.04.011
- Gonzalez W. A., R. W. A. (2008). Relación Entre La Exposición Crónica Ocupacional Al Plomo Y Los Efectos Neurocomportamentales (Especialista En Salud Ocupacional), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Groot de Restrepo, H., Sicard D., Torres, M. M. (2000). DNA damage and depair in dells of lead exposed people. *Am J Ind Med*, 38(330-334).
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), 423-434. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.022
- IARC (2006). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 87. W. H. O. I. A. F. R. O. CANCER. Lyon, France: 506.
- Johnson, F. M. (1998). The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res*, 410(2), 123-140.
- Kasperczyk, S., Kasperczyk, A., Ostalowska, A., Dziwisz, M., & Birkner, E. (2004). Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol Trace Elem Res*, 102(1-3), 61-72.
- Masuda, T., Shinoara, H., & Kondo, M. (1975). Reactions of hydroxyl radicals with nucleic acid bases and the related compounds in gamma-irradiated aqueous solution. *J Radiat Res*, 16(3), 153-161.
- McNeill, D. R., Wong, H. K., Narayana, A., & Wilson, D. M., 3rd. (2007). Lead promotes abasic site accumulation and co-mutagenesis in mammalian cells by inhibiting the major abasic endonuclease Ape1. *Mol Carcinog*, 46(2), 91-99. doi: 10.1002/mc.20196

- Møller, P., Knudsen, L. E., Loft, S., & Wallin, H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(10), 1005-1015.
- Niedzwiecki, M. M., Hall, M. N., Liu, X., Oka, J., Harper, K. N., Slavkovich, V., . Gamble, M. V. (2013). Blood glutathione redox status and global methylation of peripheral blood mononuclear cell DNA in Bangladeshi adults. *Epigenetics*, 8(7), 730-738. doi: 10.4161/epi.25012
- Olewiska, E., Kasperczyk, A., Kapka, L., Kozłowska, A., Pawlas, N., Dobrakowski, M.,. Kasperczyk, S. (2010). Level of DNA damage in lead-exposed workers. *Ann Agric Environ Med*, 17(2), 231-236.
- OSHA (2007). Occupational safety and health administration OHSAS 18001:2007, EEUU.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. T., & Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res*, 540(1), 19-28.
- Pilsner, J. R., Hu, H., Ettinger, A., Sanchez, B. N., Wright, R. O., Cantonwine, D., . . . Hernandez-Avila, M. (2009). Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. *Environ Health Perspect*, 117(9), 1466-1471. doi: 10.1289/ehp.0800497
- Rabinowitz, M. B., Wetherill, G. W., & Kopple, J. D. (1976). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest*, 58(2), 260-270. doi: 10.1172/JCI108467
- Restrepo, H. G., Sicard, D., & Torres, M. M. (2000). DNA damage and repair in cells of lead exposed people. *Am J Ind Med*, 38(3), 330-334.
- Shaik, A. P., & Jamil, K. (2009). Individual susceptibility and genotoxicity in workers exposed to hazardous materials like lead. *J Hazard Mater*, 168(2-3), 918-924. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.02.129
- Shen, L., & Zhang, Y. (2013). 5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution. *Curr Opin Cell Biol*, 25(3), 289-296. doi: 10.1016/j.ceb.2013.02.017
- Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med*, 38(3), 316-323.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells *Exp Cell Res* 175(184–191).
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., . . . Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-

hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935. doi: 10.1126/science.1170116

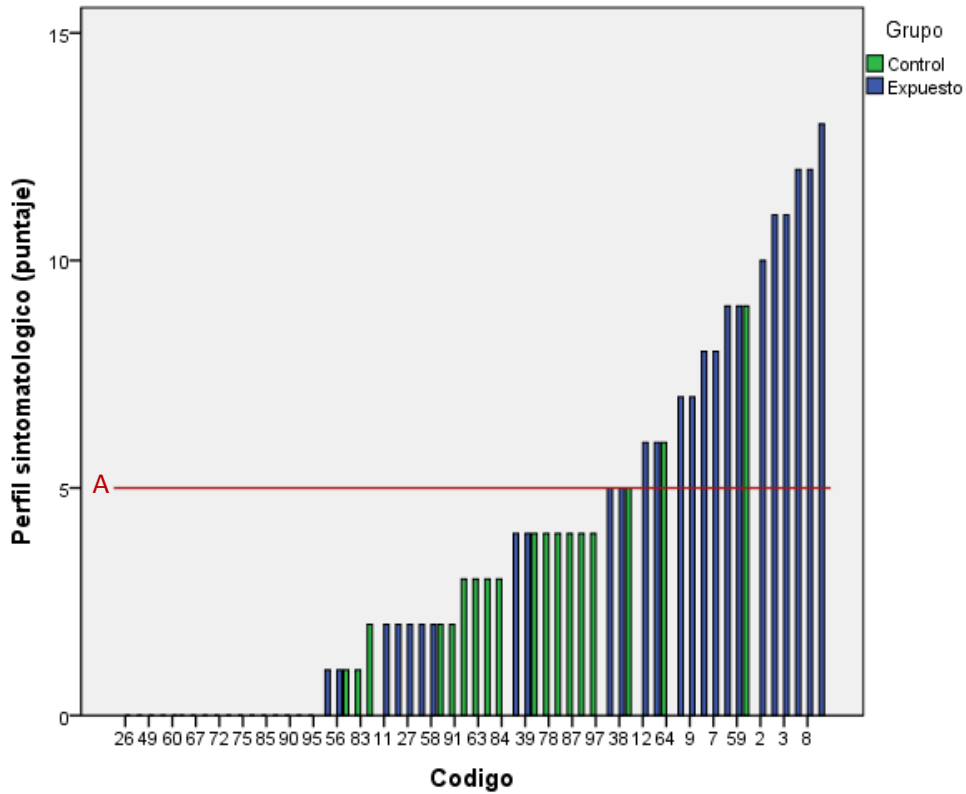
- Tell, G., Quadrioglio, F., Tiribelli, C., & Kelley, M. R. (2009). The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid Redox Signal*, 11(3), 601-620. doi: 10.1089/ars.2008.2194
- Valinluck, V., & Sowers, L. C. (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*, 67(3), 946-950. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3123
- Were, F. H., Kamau, G. N., Shiundu, P. M., Wafula, G. A., & Moturi, C. M. (2012). Air and blood lead levels in lead acid battery recycling and manufacturing plants in Kenya. *J Occup Environ Hyg*, 9(5), 340-344. doi: 10.1080/15459624.2012.673458
- Whitley, E., & Ball, J. (2002). *Statistics review 2: samples and populations*. *Crit Care*, 6(2), 143-148.
- Wright, R. O., Schwartz, J., Wright, R. J., Bollati, V., Tarantini, L., Park, S. K., . . . Baccarelli, A. (2010). Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ Health Perspect*, 118(6), 790-795. doi: 10.1289/ehp.0901429
- Zuo, S., Boorstein, R. J., & Teebor, G. W. (1995). Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA. *Nucleic Acids Res*, 23(16), 3239-3243.

## Anexos

### Anexo 1, Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para las variables de estudio

		Plomo en sangre	% de 5-hmC	% de daño	Longitud del cometa (µm)
Estadístico	Expuestos	0.79	0.89	0.81	0.946
	Controles	0.26	0.85	0.89	0.857
Significancia	Expuestos	0.002	0.003	2.96E-4	0.129
	Controles	2.87E-21	7.74E-4	0.008	0.001

### Anexo 2, Perfil sintomatológico de los participantes del estudio.



**Anexo 3,** Diferencias entre el control positivo y los grupos experimentales.

Indicador de daño	Rango promedio	P
Porcentaje de daño	Expuesto	0.11
	Control	
	Control positivo	
Longitud del cometa	Expuesto	0.66
	Control	
	Control positivo	