


# Efecto modulador del polimorfismo *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> sobre la frecuencia de micronúcleos en poblaciones ocupacionalmente expuestas a residuos de minería de carbón

## Modulator effect of *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> polymorphism in micronuclei frequency of populations occupationally exposed to coal mining residues

Shirley Salcedo Arteaga<sup>1</sup>, Lyda Espitia-Pérez<sup>1</sup>, Milton Quintana Sosa<sup>1,2</sup>

**Forma de citar:** Salcedo Arteaga S, Espitia-Pérez L, Quintana Sosa M. Efecto modulador del polimorfismo *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> sobre la frecuencia de micronúcleos en poblaciones ocupacionalmente expuestas a residuos de minería de carbón. Rev Univ Ind Santander Salud. 2017; 49(1): 17-27. DOI: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v49n1-2017002> 

### RESÚMEN

**Introducción:** La exposición ocupacional a residuos de minería de carbón puede generar un amplio rango de lesiones en el ADN potencialmente asociadas a procesos carcinogénicos y a otras enfermedades laborales. **Objetivo:** Evaluar el efecto genotóxico en el ADN de individuos ocupacionalmente expuestos a residuos de minería de carbón mediante la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos y el posible efecto modulador del polimorfismo de reparación de DNA *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> (*rs.1052133*). **Metodología:** Fueron estudiados 74 trabajadores expuestos (GE) y 74 individuos no expuestos de la población general como grupo control (GC), a los cuales se le realizaron las técnicas moleculares test de MN y genotipificación. **Resultados:** El valor promedio de la frecuencia de MN para el GE fue  $8.8 \pm 4.9$ , mientras que el valor promedio para el GC fue de  $2.9 \pm 4.0$ . En relación al tiempo de exposición y la frecuencia de MN, individuos con más de 19 años de exposición presentaron una frecuencia de MN mayor (13 – 20 MN) que los individuos entre 2 y 18 años de exposición (2-12 MN). La frecuencia de MN por áreas de trabajo, reveló que los individuos involucrados en actividades de minería presentaron una mayor frecuencia ( $11.3 \pm 3.4$ ), seguidos de los involucrados en embarque ( $9.0 \pm 5.3$ ) y trabajadores del área de acarreo ( $8.3 \pm 5.3$ ). La actividad moduladora del polimorfismo *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> sobre la frecuencia de MN en individuos del GE, evidenció una menor frecuencia ( $8.32 \pm 4.70$ ) en individuos portadores del polimorfismo *Ser/Cys*, *Cys/Cys* con relación a individuos portadores del genotipo *Ser/Ser* ( $9.06 \pm 4.95$ ). Estos hallazgos sobre la posible actividad protectora de *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> en poblaciones expuestas proveen nuevos datos sobre el posible efecto protector de este polimorfismo. **Conclusiones:** Los datos muestran que la exposición a residuos de minería de carbón genera efectos genotóxicos, y que estos daños son modulados por variantes genotípicas de los genes de reparación involucrados en la remoción de daño oxidativo.

**Palabras clave:** Minería de carbón, cielo abierto, exposición ocupacional, *hOGG1*, medio ambiente.

1. Universidad del Sinú, Montería. Córdoba, Colombia.

2. Universidad Simón Bolívar. Barranquilla Colombia

**Correspondencia:** Shirley Salcedo Arteaga. Dirección: Calle 38, Cra 1W- Barrio Juan XXIII, Montería, Córdoba, Colombia. Correo electrónico: shirleysalcedoart@gmail.com

Teléfono: +57 47811717 Ext. 1221.

## ABSTRACT

**Introduction:** Occupational exposure to coal mining residues can generate a wide range of DNA lesions potentially associated with carcinogenic processes and other work related diseases. **Objective:** To evaluate the genotoxic effects in the DNA of individuals occupationally exposed to coal mining residues considering micronucleus formation in lymphocytes (MN) as endpoints for genotoxicity and the possible modulating effect of DNA repair polymorphism *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> (*rs. 1052133*). **Methodology:** The studied population was comprised by 74 exposed workers (GE) and 74 office non-exposed referents from general population as a control group (CG). The mean frequency of MN for GE was  $8.8 \pm 4.9$ , while for GC was  $2.9 \pm 4.0$ . In regard to time of exposure and MN frequency, individuals over 19 years of exposure presented a higher frequency of MN (13-20 MN) than individuals between 2 and 18 years of exposure (2-12 MN). **Results:** Frequency of MN discriminated by working areas, revealed that the individuals involved in mining activities had a higher MN frequency ( $11.3 \pm 3.4$ ), followed by those involved in embarking ( $9.0 \pm 5.3$ ) and coal carrying activities ( $8.3 \pm 5.3$ ). Modulatory activity of the *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> polymorphism on MN frequency in GE individuals, showed a lower frequency ( $8.32 \pm 4.70$ ) in individuals carrying the polymorphism *Ser / Cys*, *Cys / Cys* compared to *Ser / Ser* ( $9.06 \pm 4.95$ ) carriers. These findings on the possible protective activity of *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> in exposed populations provide new data to the increasing evidence about the protective role of this polymorphism. **Conclusions:** Data obtained showed that exposure to coal mining residues generates genotoxic effects that could be modulated by genetic variants of repair genes involved in removal of oxidative damage.

**Keywords:** Coal mining, open-pit, occupational exposure, *hOGG1*, environment.

## INTRODUCCIÓN

El carbón es uno de los minerales más abundantes en la naturaleza y es la principal fuente de combustible fósil utilizado para la generación de energía. Sin embargo, su extracción y uso constituyen un importante factor de contaminación que representa una gran amenaza para la salud humana y las poblaciones naturales<sup>1,2</sup>. Colombia posee una de las mayores reservas naturales de este mineral en Latinoamérica y es el quinto productor de carbón térmico del mundo, con el 93% del recurso<sup>3</sup>, siendo, el yacimiento del Cerrejón, localizado al norte del departamento de La Guajira, la mayor mina de carbón a cielo abierto del mundo. En 2010, más de 33,372 trabajadores se encontraban vinculados tiempo completo en minas de carbón en el país y más de 25,000 individuos lo estaban en minas de carbón a cielo abierto<sup>4</sup>.

La creciente evidencia a nivel nacional sobre los efectos de esta actividad minera sobre las poblaciones animales<sup>5-7</sup> y humanas<sup>8</sup> expuestas a residuos generados por las actividades de extracción, plantea la necesidad de generar mecanismos de regulación más estrictos y establecer políticas de producción más limpia y amigable con el medio ambiente. Diferentes estudios han logrado establecer que algunas de las enfermedades más prevalentes entre individuos ocupacionalmente expuestos a residuos de minería de carbón, tienen su origen en el estrés oxidativo generado por la exposición crónica. En el ambiente laboral, la ruta predominante de exposición a estos residuos es a través de la

inhalación<sup>9-11</sup>, una vez en los pulmones el material más fino puede difundirse a través de los alveolos y alcanzar el torrente sanguíneo<sup>12,13</sup>, pudiendo estar involucrado en la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y el daño a células del tejido pulmonar e importantes macromoléculas como el ADN<sup>9,10</sup>.

En este orden de ideas, la susceptibilidad individual a la acción potencialmente dañina de estas sustancias puede derivar de características adquiridas o genéticas de los individuos y podría estar asociado con variaciones en enzimas metabólicas como las del citocromo o las glutatiónas y a su vez en enzimas involucradas en la reparación del daño oxidativo como el 8-oxo guanina-DNA glycosylasa1 (*hOGG1*) o el XRCC1 de la vía BER. La enzima humana *hOGG1* es una de las enzimas de la vía BER involucrada en los procesos claves del reparo de lesiones de hebra única en el ADN. *hOGG1*, una glicosilasa con actividad de escisión, contribuye a la eliminación de las guaninas oxidadas por agentes como los radicales libres<sup>14,15</sup>. Según varios autores, el material particulado (MP) generado durante los procesos industriales y de minería que puede contener metales pesados, azufre y cenizas dependiendo de las características del carbón explotado<sup>9</sup>, se constituye como la principal fuente de radicales libres<sup>16,17</sup> en los organismos. Adicionalmente, en la minería de carbón a cielo abierto, el almacenamiento del carbón en pilas de extracción al aire libre y bajo la influencia del sol, puede facilitar procesos de combustión espontánea que potencialmente podrían liberar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)<sup>18</sup>, capaces de constituir

mezclas complejas<sup>16,19,20</sup> de naturaleza desconocida, con potencial carcinogénico<sup>21-25</sup>. En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto genotóxico en el ADN de individuos ocupacionalmente expuestos a residuos de minería de carbón mediante la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos y el posible efecto modulador del polimorfismo de reparación de DNA *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> (*rs. 1052133*).

Estos resultados contribuirán a la identificación de polimorfismos en genes involucrados en el reparo del ADN que podrían tener actividad moduladora sobre los efectos observados en las poblaciones ocupacionalmente expuestas a residuos de minería de carbón. El efecto genotóxico en el ADN de individuos ocupacionalmente expuestos a residuos de minería de carbón mediante la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos y el posible efecto modulador del polimorfismo de reparación de DNA *hOGG1*<sub>Ser326Cys</sub> (*rs.1052133*).

## METODOLOGÍA

### Población de estudio

Esta investigación fue aprobada por el comité de Ética de la Universidad del Sinú. Individuos con mínimo dos años de trabajo, fueron encuestados utilizando un formato para la determinación de las características socio-demográficas de la población: edad, tiempo de exposición, posición en la cadena de producción, historial de salud, cáncer familiar, consumo de cigarrillo, alcohol, medicación, uso de protección laboral y enfermedades respiratorias. Para la elección de los participantes en el estudio fueron considerados los siguientes criterios de inclusión: ser saludable, aceptación voluntaria, exposición ocupacional  $\geq$  a 2 años, no ser fumador o no convivir con fumadores e ingesta moderada de alcohol. Como criterios de exclusión se establecieron: exposición a otros factores de riesgo ocupacional como: antecedentes de enfermedad genética o respiratoria, cáncer familiar o exposición reciente a rayos X.

Los 74 individuos con jornadas laborales completas de ocho horas fueron clasificados en tres categorías de acuerdo al tipo de trabajo realizado en el interior de la mina: *minería*, *acarreo* y *embarque*. Esta subdivisión permitió evaluar la posible existencia de actividades de riesgo dentro de la cadena de producción de carbón. En el área de *minería* fueron incluidos los individuos involucrados en actividades de manejo de

maquinaria de cabina tipo palas y excavadoras para la exposición de mantos y extracción de carbón, así como de la extinción de puntos calientes o incendios espontáneos. En la zona de *acarreo*, los individuos relacionados transportaban el carbón extraído o triturado en camiones y volquetas; mientras que los trabajadores del área de *embarque* participaron de las actividades de la estación de descarga del tren que transporta el carbón hasta los puertos de exportación de acarreo, explotación de mantos y extinción de fuegos.

Los participantes seleccionados para el estudio firmaron un consentimiento informado, constituyendo el Grupo Expuesto (GE). Cada uno de los participantes fue apareado uno a uno con los individuos del Grupo control (GC), constituido por habitantes de la zona involucrados en áreas administrativas y sin exposición conocida a residuos de minería de carbón o a cualquier otro tipo de sustancia con potencial genotóxico.

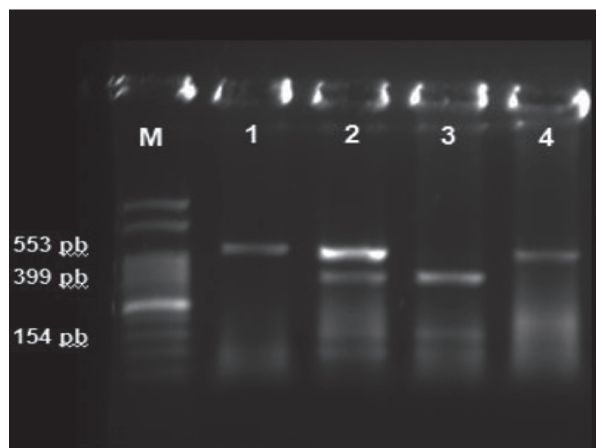
### Colecta de las muestras de sangre

Las células y el ADN requerido para los análisis citogenéticos fueron extraídos de linfocitos de sangre periférica colectada en tubos Vacutainer con heparina de sodio y EDTA respectivamente. Cada tubo fue codificado y cubierto con papel aluminio para protegerlos de la acción directa de la luz hasta su procesamiento. Muestras de sangre de los investigadores también fueron colectadas simultáneamente y bajo las mismas condiciones como control interno para evaluar posibles efectos del transporte sobre los resultados. Cada una de las muestras fue procesada dentro de las 24 horas siguientes a su obtención.

### Genotipificación

El aislamiento de células para cada muestra de sangre colectada se hizo mediante el método Ficoll–Histopaque. La digestión se llevó a cabo con proteinasa K y la posterior extracción de ADN se realizó con el Kit DNAEasy (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El genotipo *hOGG1* fue determinado por PCR/RFLPs (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) siguiendo el método descrito por De Ruyck, et al., 2007<sup>26</sup> para la determinación de los productos de digestión por electroforesis en geles de agarosa al 2%.



**FIGURA 1.** Análisis PCR-RFLPs para el polimorfismo *hOGG1*

Línea 1 individuos salvajes (Ser/Ser) sin sitio de corte, fragmento de 153pb

Línea 2 individuos heterocigotos (Ser/Cys) fragmento de 553, 399 y 154pb

Línea 3 individuos homocigoto mutante (Cys/Cys) fragmento 399 y 154pb.

### Test de Micronúcleos en linfocitos.

El test de MN fue aplicado según el protocolo descrito por Fenech, 2007<sup>27</sup>. Rápidamente, para cada individuo fueron cultivados 0.5mL de sangre en 4.5mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma R8778, USA) suplementado con 2 mL de L-glutamina (Sigma G7513, USA), 10% de suero fetal bovino (Gibco/ invitrogen 15000, Brazil), 100mL/mL antibiótico-antimicótico (Sigma A 5955, USA). Los linfocitos fueron estimulados a dividirse con (1µg/mL) de fitohemaglutinina (Sigma L8754), el medio fue incubado a 37°C con 5% de Co<sub>2</sub>, en tubos plásticos (Falcon 3033). A las 44h del cultivo se agregó citocalasina B (6µg/mL concentración final, Sigma C6762) a fin de bloquear la citocinesis. A las 72 horas de incubación las células fueron colectadas por centrifugación y tratadas con solución hipotónica (NaCl 0,9% / KCl 0,075 M, 9:1) para lograr la preservación del citoplasma.

La fijación se realizó con metanol / ácido acético (3:1) y se coloreó con Giemsa al 6% (pH 6,8), por 10 minutos la frecuencia de MN fue establecida evaluando 2000 células binucleadas por individuos, las placas portaobjetos fueron analizadas a doble ciego, con un microscopio óptico de campo claro (40X de magnificación) aplicando los criterios de evaluación descritos por Fenech, et al.<sup>28</sup> para la identificación de células binucleadas y MN.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis descriptivo de las variables cualitativas y cuantitativas que se identificaron mediante encuesta, como sexo, consumo de alcohol, consumo de cigarrillo, edad, tiempo de exposición a residuos de minería de carbón entre otros, que se constituyeron en las características del grupo.

Las diferentes variables fueron sometidas a análisis de asociación mediante pruebas de significancia estadísticas Kolmogorov-Smirnov y  $\chi^2$ , una vez registradas las frecuencias promedio de MN en los grupos estudiados para probar las hipótesis respectivas, con un nivel de significancia máximo de 0.05. Se utilizaron pruebas t- student con variables reales mediante ANOVA factorial, se identificó la interacción en la inducción de micronúcleos con el factor ambiental (exposición o no a residuos de minería de carbón).

En el modelo de ANOVA se incluyeron las variables (edad, tiempo y exposición) con el fin de ajustar los resultados e identificar las diferencias en las frecuencias promedio de MN con el menor sesgo posible. Finalmente se estableció el grado y tipo de asociación, mediante regresión lineal, entre las frecuencias promedios de MN y las variables cuantitativas edad y tiempo de exposición. Adicionalmente, se determinó si las frecuencias alélicas de la población estudiada se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg. Se realizó una regresión Poisson para MN en función de la interacción exposición-genotipo.

## RESULTADOS

Los datos demográficos de la población de estudio se encuentran descritos en la **Tabla 1**. El valor promedio de edad para el GE de 44,1±7,4 años (24 a 59 años), mientras que para el GC fue de 43,2±7,1 años (25 a 60 años).

**TABLA 1.** Características demográficas de la población estudiada

Características demográficas	Grupos	
	No Expuestos	Expuestos
Número de individuos	74	74
Edad (promedio±SD <sup>a</sup> )	43,2±7,1	44,1±7,4
Tiempo de exposición (promedio±SD <sup>a</sup> )	-	18,1±6,7
Consumo de alcohol (%)		
No consumen alcohol	35%	65%
Consumidores de alcohol <sup>b</sup>	65%	35%

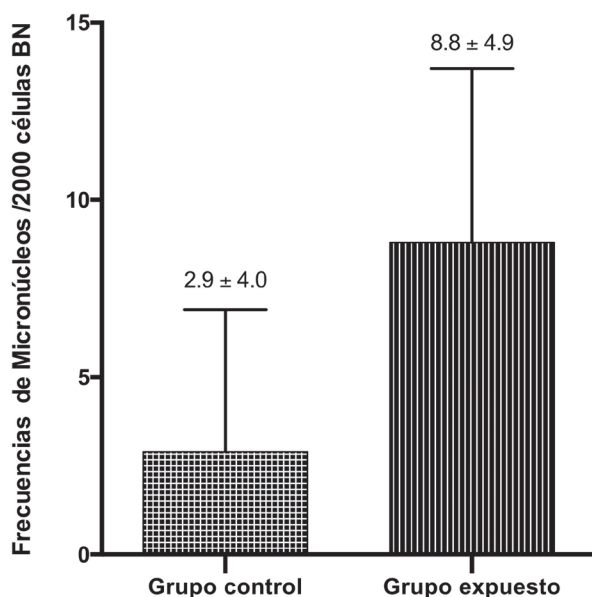
<sup>a</sup> SD (desviación estándar)

<sup>b</sup> Consumen alcohol por lo menos una vez a la semana



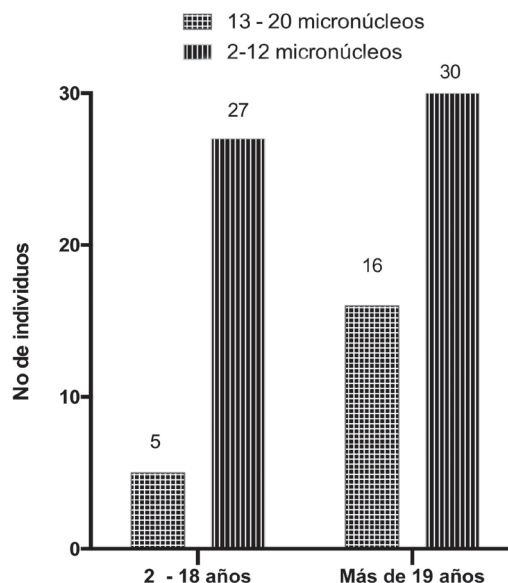
Para el GE el valor promedio de MN en 2000 células binucleadas fue casi tres veces superior al promedio registrado para el GC encontrándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p \leq 0,05$ ).

La edad de los individuos no influyó la frecuencia de MN en ninguno de los grupos estudiados. El porcentaje de consumo de alcohol en el GE fue relativamente bajo (35%), mientras que en el GC el 65% de los individuos reportaron consumo de alcohol de al menos una vez por semana. Esta variable no influyó la frecuencia de MN observada en ambos grupos. La diferencia de MN entre el grupo expuesto y el grupo control fue de  $8,8 \pm 4,9$  para el GE y  $2,9 \pm 4,0$  para el GC, evidenciando una diferencia significativa entre la frecuencia de MN de ambos grupos **Figura 2**.



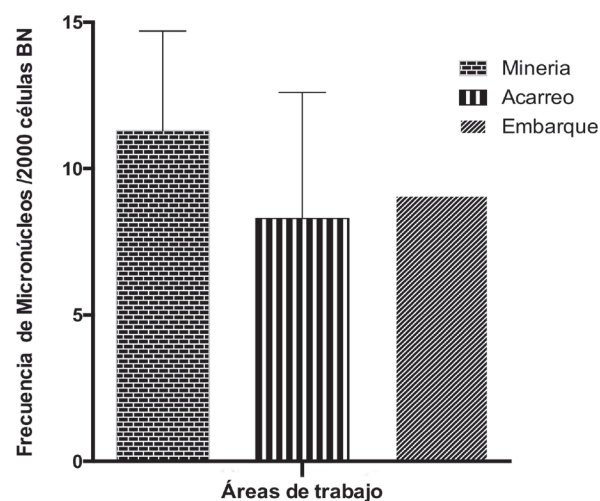
**FIGURA 2.** Frecuencia de micronúcleos

La influencia del tiempo de exposición sobre la frecuencia de MN es evidenciada en la **Figura 3**. El valor promedio de exposición (tiempo de trabajo) en el GE fue de  $18,1 \pm 6,7$  años (2 a 18 años). Al evaluar la influencia del tiempo de exposición (tiempo de trabajo) en la frecuencia de MN se pudo evidenciar que un mayor número de individuos con más de 19 años de exposición permanente presentaron una frecuencia de MN mayor (13 – 20 MN) que los individuos con entre 2 y 18 años de exposición (2-12 MN).



**FIGURA 3.** Asociación del tiempo de exposición con la frecuencia de Micronúcleos

La frecuencia de MN estimada por áreas de trabajo reveló que los individuos involucrados en el área de *minería* presentaron una frecuencia mayor ( $11,3 \pm 3,4$ ), seguido de los individuos del área de *embarque* ( $9,0 \pm 5,3$ ) y del área de *acarreo* ( $8,3 \pm 5,3$ ). Al comparar los promedios de las frecuencias de MN en cada una de las áreas descritas se estableció la presencia de una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de cada una **Figura 4**. Este resultado podría evidenciar la existencia de grupos de actividades que dentro de la cadena de producción de carbón que representan un mayor riesgo para los individuos involucrados en ellas.



**FIGURA 4.** Promedio de Micronúcleos por área de trabajo

La **Tabla 2** muestra los análisis de la regresión de Poisson para la frecuencia de MN y cada uno de los polimorfismos de *hOGG1*<sup>Ser326Cys</sup>. Individuos con el genotipo *Ser/Cys*, *Cys/Cys* pertenecientes al GE, presentaron menor frecuencia de MN ( $8.32 \pm 4.70$ ) en linfocitos con relación a los individuos expuestos que portadores del genotipo *Ser/Ser* ( $9.06 \pm 4.95$ ), demostrando un posible efecto protector de este polimorfismo en poblaciones expuestas a residuos de minería de carbón.

Este efecto no fue observado en GC donde los individuos que portan el genotipo *Ser/Cys*, *Cys/Cys* presentaron una mayor frecuencia de MN ( $3.03 \pm 3.89$ ) comparados con individuos del mismo grupo con el genotipo silvestre *Ser/Ser* ( $2.85 \pm 4.20$ ). El valor de referencia para la evaluación del efecto modulador fue calculado usando el genotipo silvestre en población control como el genotipo de menor riesgo.

**TABLA 2.** Frecuencia de MN en función de la interacción Exposición-genotipo.

Gene	Genotipo	Exposición	Frecuencia de MN	Riesgo Relativo	95% CI	p-Valor
			(promedio $\pm$ SD <sup>a</sup> )	(RR)		
<i>hOGG1</i>	<i>Ser/Ser</i>	No-expuesto	<b>2.85 <math>\pm</math> 4.20</b>	Referencia <sup>b</sup>	-	-
	<i>Ser/Cys</i> , <i>Cys/Cys</i>	No-expuesto	<b>3.03 <math>\pm</math> 3.89</b>	1.07	0.81-1.39	0.659
	<i>Ser/Ser</i>	Expuesto	<b>9.06 <math>\pm</math> 4.95</b>	3.18	2.59-3.89	<0.05
	<i>Ser/Cys</i> , <i>Cys/Cys</i>	Expuesto	<b>8.32 <math>\pm</math> 4.70</b>	2.92	2.43-3.49	<0.05

<sup>a</sup> SD

<sup>b</sup> El valor de referencia fue calculado usando el genotipo silvestre en grupos controles (genotipo de menor riesgo)

La frecuencia alélica/genotípica de *hOGG1* no se encontró en equilibrio Hardy – Weinberg para la población estudiada, lo cual podría deberse a un moderado efecto de deriva genética previamente descrita para la población de la Guajira<sup>29</sup> o a una panmixia incompleta, fuertemente asociada a algunos

aspectos de matrimonios intra-étnicos típicos en las poblaciones indígenas que constituyen el principal componente racial en esta región del norte del país (**Tabla 3**). Todas las variantes alélicas coincidieron con los valores previamente descritos para poblaciones colombiana<sup>30</sup>, brasilera<sup>31</sup> y caucásica<sup>32</sup>.

**TABLA 3.** Distribución de los genotipos de *hOGG1* y frecuencia de sus variantes alélicas en el grupo expuesto y el control.

Gen	Genotipo	Exposición		p*	Frecuencia Total observada	Frecuencia en el equilibrio	p**	Frecuencia Alélica/Genotípica
		Grupo no Expuesto	Grupo Expuesto					
		n (%)	n (%)					
<sup>b</sup> <i>hOGG1 Ser326Cys</i>	<i>Ser/Ser</i>	46 (46)	53 (53)	0.6	99 (67)	108	<0.01	<i>Ser</i> : 0.73
	<i>Ser/Cys</i>	15 (15)	11 (11)		26 (17)	78		
	<i>Cys/Cys</i>	13 (13)	10 (10)		23 (16)	14		<i>Cys</i> : 0.26

\* Significancia estadística de diferencias genotípicas entre expuestos y controles determinados por  $\chi^2$  test

\*\* Significancia estadística de las diferencias estadísticas entre valores esperados y observados

<sup>b</sup> No se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg

## DISCUSIÓN

La principal ruta de exposición de los trabajadores de minas de carbón a residuos potencialmente peligrosos, es a través de la inhalación de partículas. La inhalación crónica que puede contener una mezcla de metales pesados, ceniza, hierro, HAPs y azufre, puede producir desde desórdenes pulmonares, (neumoconiosis simple, fibrosis masiva progresiva, bronquitis, pérdida de función pulmonar, enfisema) hasta cáncer<sup>19,20</sup>. En este contexto, los residuos de minería, su comportamiento en los pulmones y la significancia del estrés oxidativo

en los desórdenes respiratorios y el origen del cáncer han recibido especial atención<sup>21</sup>. Recientes estudios han podido establecer que algunas de estas enfermedades podrían tener su origen en el daño genotóxicos generado por la inhalación de este material particulado, capaz de interactuar con los macrófagos, células epiteliales y otras células, generando la producción de grandes cantidades de EROs. Otras sustancias también presentes en grandes cantidades en las mezclas y el polvo de carbón, como los HAPs los cuales presentan una actividad mutagénica reconocida y han sido asociados con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón, piel y vejiga<sup>25,33</sup>.

En el presente estudio, se pudo evidenciar diferencias significativas en el daño citogenético determinado por diferencias en la frecuencia de MN entre dos poblaciones de individuos. Para el GE el valor promedio de MN en 2000 células binucleadas fue casi tres veces superior al promedio registrado para el GC ( $p \leq 0,05$ ).

Pese a que el desarrollo de cáncer y de lesiones precancerígenas constituyen eventos multifactoriales, la frecuencia elevada de MN podría indicar un riesgo tres veces mayor de desarrollar cáncer en el GE<sup>34</sup>. En Colombia, efectos similares de la exposición a residuos de minería de carbón a cielo abierto han sido evidenciados en estudios realizados en poblaciones de roedores<sup>5</sup>, reptiles y plantas<sup>7</sup> y trabajadores con exposición ocupacional<sup>8</sup>, lo que sugeriría la necesidad de profundizar en la problemática de la contaminación en las zonas mineras y en el impacto real sobre las diferentes poblaciones expuestas.

Considerando la naturaleza crónica de la exposición a estos residuos, gran parte de los estudios realizados al respecto han encontrado una relación directa entre el tiempo de exposición y la magnitud del daño<sup>35-37</sup>. En este estudio, los individuos con más de 19 años de exposición permanente, presentaron una frecuencia de MN mayor (13-20 MN) que los individuos con entre 2 y 18 años de exposición (2-12 MN). Este resultado es consistente con otros hallazgos reportados alrededor de poblaciones ocupacionalmente expuestas donde la frecuencia de daño fue directamente proporcional con el tiempo de trabajo<sup>38,39</sup>.

Contrario a lo observado en el tiempo de exposición, otras variables como el consumo de alcohol y la edad no mostraron una influencia significativa sobre la frecuencia de MN. A pesar de que la edad es uno de los principales factores involucrados en un aumento en la frecuencia de MN tanto en poblaciones expuestas como controles<sup>40,41</sup>. El consumo de alcohol no aparece como un elemento continuamente asociado con un aumento en el número de MN en poblaciones expuestas<sup>42,43</sup>.

En el análisis dentro de la cadena de producción del carbón, los individuos encargados de las actividades de *minería* y *embarque* presentaron la mayor frecuencia de MN, mientras que los individuos involucrados en el *acarreo* presentaron las frecuencias más bajas. Los mayores valores de frecuencia de MN en el área de *minería* se pueden explicar por el hecho de estar expuestos a una mayor cantidad de MP y a la presencia de HAPs generados en los incendios espontáneos y puntos calientes que son sofocados por los operarios,

mientras que en las actividades de *acarreo* y *embarque* se genera mucho menos MP.

Los individuos del grupo GE con la variante genotípica *Ser/Cys*, *Cys/Cys* para *hOGG1* presentaron la menor frecuencia de MN y el menor RR en comparación para aquellos que portan la variante *Ser/Ser* para el mismo grupo (GE). Estos datos muestran que las personas expuestas a minería de carbón con la variante *Ser/Ser* del genotipo *hOGG1* podrían tener un reparo de lesiones oxidativas de manera más lenta con respecto a los portadores del polimorfismo *Ser/Cys*, *Cys/Cys*. Posiblemente este fenómeno se deba a que la variante *Ser/Cys* es relevante solo bajo condiciones de sobreexpresión, por ejemplo en células inducidas, lo que es consistente con los resultados obtenidos por Jansen, et al.<sup>44</sup>, quien evaluó la actividad de reparación de 8oxoG, en células de mamíferos sometidas a estrés oxidativo y observó que las células sometidas a mayores concentraciones de radiación iónica reparaban las lesiones, en comparación con las células sometidas a bajas dosis de radiación ionizante. Si bien, las actividades de reparación mejoradas de la variante *Ser/Cys* (polimorfismo) no están totalmente dilucidadas, los individuos con actividad reducida de *hOGG1* tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas como el cáncer, debido a una reparación incompleta bajo estrés oxidativo<sup>34</sup>. Esta expresión diferencial en la actividad de reparación del gen *hOGG1*, puede estar relacionada con la dosis de xenobióticos recibida, teniendo en cuenta que la reparación de 8oxoG es más pobre en comparación a otras lesiones del ADN<sup>35</sup>.

La acción de *hOGG1* no tuvo un impacto significativo sobre el estimador de Asociación (**Tabla 2**) para frecuencias MN en los linfocitos. La posible explicación para esta falta de efecto de modulación podría derivarse de la naturaleza de la exposición en sí. Los resultados descritos hasta ahora en la literatura demuestran que la inhibición de la reparación del ADN, esencialmente reparación por escisión de base (BER) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER), es un mecanismo común en genotoxicidad inducida por metales<sup>45</sup>. La abundancia de los diferentes elementos minerales en el carbón del Cerrejón ha sido determinada por programas de control computarizado y microscopía electrónica de barrido, los cuales revelan que más del 80 por ciento del peso del material mineral se compone de minerales de arcilla y cuarzo (silicato de aluminio, silicato de aluminio y sílice). El análisis del producto revela que las cenizas de combustión se forman principalmente de silicatos de aluminio, óxido de hierro y partículas de cuarzo<sup>46</sup>.

En un estudio previo, se detectó un contenido significativo de elementos inorgánicos como el aluminio (Al) y silicio (Si) en sangre periférica de la misma población de mineros de carbón<sup>8</sup>. Varios estudios han demostrado que los iones de Al inhiben proteínas con dominios de zinc<sup>47</sup> y la reparación del ADN en linfocitos<sup>48</sup>. Tales dominios han sido identificados en la enzima de reparación del ADN como *hOGG1*<sup>47,48</sup> que interactúan con el gen *XRCC1* en vía BER.

A la fecha, se desconoce si los polimorfismos de los genes de reparo *hOGG1*, *XRCC1* y *XRCC3* pueden predecir el rompimiento del ADN y reparar daños genotóxicos en trabajadores expuestos; en este contexto, Aka, et al.<sup>35</sup> encontraron que la población control con genotipo *hOGG1* con variante *Ser/Ser* presentaron una mayor frecuencia de MN en comparación con los controles portadores de variante *Ser/Cys*. Este estudio concluyó que la frecuencia de MN es no dependiente de roturas del ADN, pero si por pérdida cromosómica, ya que la acción de *hOGG1* constituye una de las primeras vías de reparación del ADN. Si ésta reparación se da de manera ineficiente, las células seguirían con su proceso de replicación cromosómica, en donde el ADN es susceptible de sufrir quiebres o rompimientos en ambas cadenas, por lo cual se evidenciará una mayor frecuencia de MN en la siguiente división celular<sup>35</sup>.

Basados en estos resultados de investigaciones donde la frecuencia de MN en las poblaciones estudiadas fluctúa en cuanto a expuestos y controles, dependiendo de las variantes genotípicas que portan para el gen *hOGG1*, no es posible seleccionar un solo genotipo para la predicción de la susceptibilidad genética en poblaciones expuestas a minería de carbón a cielo abierto, sin embargo, es posible que como se ha evidenciado en investigaciones anteriores el daño oxidativo sea pieza clave en el inicio de lesiones sobre el DNA.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la exposición ocupacional a residuos de minería de carbón genera efectos genotóxicos relacionados con un aumento en la frecuencia de MN en individuos que laboran en sistemas a cielo abierto y que tales daños son modulados por variantes genotípicas en los genes de reparación de ADN involucrados en la remoción de lesiones oxidativas.

Igualmente, los efectos observados, como el aumento en la frecuencia de MN son acumulativos y dependientes del tiempo de exposición (tiempo de trabajo) y presentan incidencia diferenciada en individuos involucrados en

actividades como la minería, el acarreo y el embarque del carbón.

Estos datos resultan interesantes no solo por abordar el tema de la exposición ocupacional a residuos de minería de carbón desde el punto de vista genotóxico, mutagénico y citotóxico, sino porque advierten sobre la necesidad de una regulación más estricta a nivel nacional al respecto de la explotación de carbón, al establecimiento de políticas de producción más limpia, a la exploración del uso de baterías de test para el monitoreo de poblaciones expuestas y la validación de biomarcadores de respuesta biológica con el propósito de poder identificar posibles riesgos para la salud e integridad de las poblaciones expuestas.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto se realizó de acuerdo a las normas técnicas, científicas y administrativas para la investigación en salud que aparecen consignados en la resolución 008430 del 4 de Octubre de 1993 del Ministerio de Salud.

Según el mismo, este estudio puede ser considerado como investigación sin riesgo para los individuos participantes. El proyecto de investigación se realizó al mismo tiempo con la debida autorización del comité ético institucional y atendiendo los requisitos del consentimiento informado para la extracción, análisis y procesamiento de material genético y celular de cada individuo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al SINTRACARBÓN (Sindicato de Trabajadores del Carbón) por el apoyo y la disposición de la población obrera adscrita para participar en la socialización y ejecución del proyecto.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores del presente manuscrito declaramos que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

1. Zakrzewski 1919- SF. Principles of environmental toxicology. Washington; 1991.
2. Chen Y, Shah N, Huggins FE, Huffman GP. Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. Environ Sci Technol. 2005; 39(4): 1144-1151.



3. Olivero Verbel J, Caballero Gallardo K, Guerrero Castilla A, Vargas Valencia F. RENM. Minería en Colombia Institucionalidad y territorio, Paradojas y Conflictos. Contraloría General de la República. Bogota; 2013. 229-335 p.
4. Dirección de minas. Política Nacional de Seguridad Minera, in Política nacional de Seguridad Minera. Ministerio de Minas y energía 2011. 54p
5. León G, Pérez LE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res.* 2007; 630(1-2): 42-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.02.007>.
6. Cabarcas-Montalvo M, Olivero-Verbel J, Corrales-Aldana H. Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. *Sci Total Environ.* 2012; 416:208-2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.080.
7. Coronado-Posada N, Cabarcas-Montalvo M, Olivero-Verbel J. Phytotoxicity assessment of a methanolic coal dust extract in *Lemna minor*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013; 95: 27-32. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.05.001
8. León-Mejía G, Espitia-Pérez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JAP, et al. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci Total Environ.* 2011; 409(4): 686-691. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.10.049.
9. Schins R, Borm PJ. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a Review. *Ann Occup Hyg.* 1999; 43(1): 7-33.
10. Schins RP, Schilderman PA, Borm PJ. Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 1995; 67(3): 153-157.
11. Keeler GJ, Morishita M, Young LH. Characterization of complex mixtures in urban atmospheres for inhalation exposure studies. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 57 (Suppl 1): 19-29.
12. Könczöl M, Goldenberg E, Ebeling S, Schäfer B, Garcia-Käufer M, Gminski R, et al. Cellular uptake and toxic effects of fine and ultrafine metal-sulfate particles in human A549 lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(12): 2687-2703. DOI: 10.1021/tx300333z.
13. Rothen-Rutishauser B, Blank F, Mühlfeld C, Gehr P. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; 4(8): 1075-1089. DOI: 10.1517/17425255.4.8.1075.
14. da Silva ALG, da Rosa HT, Karnopp TE, Charlier CF, Ellwanger JH, Moura DJ, et al. Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes. *BMC Med Genet.* 2013; 14(1): 93. DOI: 10.1186/1471-2350-14-93.
15. Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antônio Pêgas Henriques J, et al. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen.* 2011; 52(1): 20-27. DOI: 10.1002/em.20562.
16. Aneja VP, Isherwood A, Morgan P. Characterization of particulate matter (PM10) related to surface coal mining operations in Appalachia. *Atm Environ.* 2012; 54: 496-501. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.02.063>.
17. Hsiao WL, Mo ZY, Fang M, Shi XM, Wang F. Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5--10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutat Res.* 2000; 471(1-2): 45-55.
18. GJ Pitt, GR Millward. Coal and modern coal processing: an introduction in coal an introduction to its formation and properties. California. Academic Press, 1979.
19. Current intelligence bulletin 64. Coal mine dust exposures and associated health outcomes. DHHS NIOSH 2011.
20. da Silva J, de Freitas TR, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(4): 270-278.
21. Agova S, Groseva D, Panev T, Popov T, Toncheva D, Hadjidekova VB. Effect of environmental exposure to PAHs on somatic chromosomes. *Turkish J Med Sci.* 2005; 35(3): 143-148.
22. Audebert M, Zeman F, Beaudoin R, Péry A, Cravedi JP. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260(1): 58-64. DOI: 10.1016/j.taap.2012.01.022.
23. Binková B, Topinka J, Mračková G, Gajdošová D, Vidová P, Stávková Z, et al. Coke oven workers study: the effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct levels in white blood cells and lymphocytes as determined by 32P-postlabelling. *Mutat Res Toxicol.* 1998; 416(1-2): 67-84.
24. Gurbani D, Bharti SK, Kumar A, Pandey AK, Ana GREE, Verma A, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human

- alveolar and bronchiolar cells. *Int J Hyg Environ Health*. 2013; 216(5): 553-565. DOI: 10.1016/j.ijheh.2013.04.001.
25. Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect*. 1996; 104(11): 1166-1170.
  26. De Ruyck K, Szaumkessel M, De Rudder I, Dehoorne A, Vral A, Claes K, et al. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutat Res*. 2007; 631(2): 101-110. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.03.010.
  27. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007; 2(5): 1084-1104. DOI: 10.1038/nprot.2007.77.
  28. Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res*. 2003; 534(1-2): 45-64.
  29. Rojas MY, Alonso LA, Sarmiento VA, Eljach LY, Usaquén W. Structure analysis of the La Guajira-Colombia population: a genetic, demographic and genealogical overview. *Ann Hum Biol*. 2013; 40(2): 119-131. DOI: 10.3109/03014460.2012.748093.
  30. Hoyos-Giraldo LS, Carvajal S, Cajas-Salazar N, Ruíz M, Sánchez-Gómez A. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res*. 2009; 666(1-2): 8-15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.03.003.
  31. Duarte MC, Colombo J, Rossit ARB, Silva AE. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in a Brazilian population. *Genet Mol Biol*. 2005; 28(3): 397-401. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572005000300011>.
  32. Garte S. Metabolic susceptibility genes as cancer risk factors: time for a reassessment?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10(12): 1233-1237.
  33. Boström C-E, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*. 2002; 110(Suppl 3): 451-488.
  34. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007; 28(3): 625-631. DOI: 10.1093/carcin/bgl177.
  35. Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res*. 2004; 556(1-2): 169-181. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.08.002.
  36. Rohr P, da Silva J, da Silva FR, Sarmento M, Porto C, Debastiani R, et al. Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. *Environ Mol Mutagen*. 2013; 54(1): 65-71. DOI: 10.1002/em.21744.
  37. Rohr P, Kvitko K, da Silva FR, Menezes APS, Porto C, Sarmento M, et al. Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal. *Mutat Res*. 2013; 758(1-2): 23-28. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.08.006.
  38. Jiao J, Feng NN, Li Y, Sun Y, Yao W, Wang W, et al. Estimation of a safe level for occupational exposure to vinyl chloride using a benchmark dose method in central china. *J Occup Health*. 2012; 54(4): 263-270.
  39. Wang W, Qiu Y-L, Jiao J, Liu J, Ji F, Miao W-B, et al. Genotoxicity in vinyl chloride-exposed workers and its implication for occupational exposure limit. *Am J Ind Med*. 2011; 54(10): 800-810. DOI: 10.1002/ajim.20990.
  40. Migliore L, Parrini M, Sbrana I, Biagini C, Battaglia A, Loprieno N. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat Res*. 1991; 256(1): 13-20.
  41. Fenech M, Morley AA. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res*. 1985; 148(1-2): 99-105.
  42. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, et al. Human Micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 37(1): 31-45.
  43. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26(1): 43-49. DOI: 10.1093/mutage/geq050.
  44. Jensen A, Løhr M, Eriksen L, Grønbæk M, Dorry E, Loft S, et al. Influence of the OGG1 Ser326Cys polymorphism on oxidatively damaged DNA and repair activity. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1): 118-125. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.038.
  45. Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by

- carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett.* 2002; 127(1-3): 47-54.
46. Great Britain. The fate of trace elements in pulverised fuel (PF) combustion systems. department of trade and industry, clear coal technology program.
47. Hanas JS, Gunn CG. Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24(5): 924-930.
48. Lankoff A, Banasik A, Duma A, Ochniak E, Lisowska H, Kuszewski T, et al. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Lett.* 2006; 161(1): 27-36. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.07.012.