

————— *Artículo Original* —————

## **Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno\***

BLANCA LAFFON LAGE, BEATRIZ PÉREZ CADAHÍA Y  
JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO

*Departamento de Biología Celular y Molecular  
Universidad da Coruña*

### **RESUMEN**

El estireno es un compuesto orgánico de gran interés comercial que se utiliza ampliamente en la manufactura de numerosos productos. La exposición a estireno se ha asociado con efectos genotóxicos, fundamentalmente tras activación metabólica a estireno-7,8-óxido (SO). El SO es detoxificado por la epóxido hidrolasa o, en menor grado, por las glutatión S-transferasas. En el presente estudio se ha evaluado la influencia de los siguientes factores en la genotoxicidad del estireno: factores fisiológicos y de hábitos de vida, y polimorfismos genéticos en las mencionadas enzimas metabólicas (EPHX1 exones 3 y 4, GSTP1 exones 5 y 6, y los polimorfismos de delección de GSTM1 y GSTT1). El diseño experimental consistió en exposición de leucocitos periféricos procedentes de 30 donantes sanos a dos dosis de SO, o a un solvente control, y evaluación de la genotoxicidad por medio del test de micronúcleos (MN) y el ensayo del cometa. Los resultados obtenidos muestran que la frecuencia de MN y el daño en el ADN inducidos por el SO se ven influenciados por la edad; sin embargo no se ha detectado influencia del consumo de tabaco, resultando poco claro el efecto del sexo. Se ha observado incremento en la longitud de la cola del cometa a medida que desciende la actividad epóxido hidrolasa en células expuestas a SO, e incremento en la frecuencia de MN en donantes de baja actividad. Estos resultados son consecuentes con la actividad detoxificadora de esta enzima. Además, se han detectado incrementos en la frecuencia de MN para los genotipos GSTP1 \*A/\*B y \*A/\*C con respecto a los homocigotos salvajes \*A/\*A. Esto puede deberse a una baja actividad detoxificadora como consecuencia de la afinidad alterada de la proteína variante por el SO. Para los genotipos GSTM1

---

\* Premio Alcalíber de la Real Academia Nacional de Farmacia 2002

y GSTT1 no se obtuvieron resultados claros, incluso tras agrupar a los individuos con la misma actividad epóxido hidrolasa esperada, probablemente debido a que la conjugación con glutatión juega un papel minoritario en el metabolismo del estireno.

**Palabras clave:** Estireno.—Test de micronúcleos.—Ensayo del cometa.—Polimorfismos genéticos.—Glutathione S-transferasa.—Epóxido hidrolasa.

## SUMMARY

### Influences of certain polymorphisms of metabolic enzymes in the genotoxicity of the styrene

Styrene is an organic chemical of great commercial interest widely used in the manufacture of many industrial products. Exposure to styrene has been associated with genotoxic effects, mainly after metabolic activation to styrene-7,8-oxide (SO). SO is detoxified by epoxide hydrolase or, to a minor extent, by glutathione S-transferases. In the present study we have evaluated the influence of the following factors in the genotoxicity of SO in human leukocytes: physiologic and lifestyle factors, and genetic polymorphisms in the mentioned metabolic enzymes (EPHX1 exons 3 and 4, GSTP1 exons 5 and 6, and GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms). The experimental design consisted in exposure of peripheral leukocytes from 30 healthy donors to two SO doses, or to a solvent control, and evaluation of genotoxicity by means of micronucleus (MN) test and comet assay. Results obtained show that MN frequency and DNA damage induced by SO are affected by age; however influence of tobacco consum has not been detected, and sex effect is few clear. An increase in induced comet tail length with decreasing epoxide hydrolase activity in SO-exposed cells, and an increase in MN frequency in low activity donors was observed. This findings are consistent with the detoxifying activity of this enzyme. In addition, increases in MN frequencies for GSTP1 \*A/\*B and \*A/\*C genotypes with regard to the wild-type homozygous \*A/\*A genotype were detected. This may be due to a low detoxifying activity as a consequence of altered SO affinity of the variant protein. No clear results were obtained for GSTM1 or GSTT1 genotypes, even when performing the analysis after grouping individuals with the same expected epoxide hydrolase activity, probably due to the minor role that glutathione conjugation plays in styrene metabolism.

**Keywords:** Styrene.—Micronucleus test.—Comet assay.— Genetic polymorphisms.—Glutathione S-transferase.—Epoxide hydrolase.

## INTRODUCCIÓN

### 1. ESTIRENO

El estireno es un líquido oleoso, incoloro o amarillento, muy refractario y con olor característico. Su estructura química corresponde a un hidrocarburo aromático monocíclico con un grupo vinilo muy reactivo, que polimeriza y se oxida rápidamente en presencia de aire o luz.

Se trata de una sustancia de gran relevancia debido a su empleo en la manufactura de numerosos productos. La elevada importancia comercial de este compuesto radica en la obtención a partir del mismo de numerosos polímeros y copolímeros, entre los que destaca el poliestireno, usado en la producción de materiales de embalaje, contenedores, juguetes, equipos deportivos, maquinarias eléctricas, etc. Asimismo, el poliestireno expandido se utiliza ampliamente como aislante térmico en la construcción de edificios y equipos de refrigeración.

El estireno está presente en el aire a niveles muy bajos en la mayoría de países desarrollados, generándose en procesos industriales, gases de escape de los automóviles y humo del tabaco, fundamentalmente. En cualquier caso, las exposiciones humanas más importantes al estireno tienen lugar en el marco ocupacional, principalmente por inhalación en la producción de plásticos reforzados con fibra de vidrio, durante la cual hasta un 10% del estireno contenido en la resina puede evaporarse y pasar al medio ambiente, especialmente en los procesos de laminación manual, difícilmente mecanizables.

La metabolización constituye la principal forma de eliminación del estireno. Por acción de las monooxigenasas del citocromo P450 se genera estireno-7,8-óxido (SO). A continuación se produce feniletilenglicol por apertura del anillo oxirano mediante la epóxido-hidrolasa y, posteriormente, a partir de él se forman ácido mandélico (MA) y ácido fenilglioxílico (PGA). Como metabolitos menores se producen ácido benzoico, ácido hipúrico y 2- y 4-vinilfenol. Por otra parte, a través de una ruta minoritaria, el SO puede conjugarse con el glutatión por acción de las glutatión S-transferasas (GST) median-

te reacciones de fase II del metabolismo, y dar lugar, finalmente, a conjugados con la cisteína.

Se considera que el estireno posee una toxicidad aguda de baja a moderada tanto en humanos como en animales de laboratorio, siendo sus principales efectos la irritación de la piel y del tracto respiratorio y la alteración del sistema nervioso central (Bond, 1989). Respecto a la toxicidad crónica del compuesto, se ha investigado fundamentalmente su carcinogenicidad, debido a la existencia de diversos estudios que sugieren un incremento del riesgo de mortalidad por leucemia o linfoma asociado a la exposición a estireno (Matanoski *et al.*, 1990; Bond *et al.*, 1992; Santos-Burgoa *et al.*, 1992). Sin embargo, existen otras investigaciones cuyos datos no corroboran dicha hipótesis (Newhook *et al.*, 1994). La explicación más plausible para las discrepancias existentes radica en la exposición simultánea de los individuos a otros compuestos y en la debilidad de las relaciones dosis-respuesta descritas (Keshava y Ong, 1999).

En cuanto a la actividad mutagénica y clastogénica del estireno, existe una gran variedad de trabajos publicados, y los datos sugieren que el estireno es mutagénico únicamente tras activación metabólica (Bond, 1989; Scott y Preston, 1994), ya que las respuestas genotóxicas positivas han requerido generalmente la presencia de un sistema activador externo, y se propone como principal elemento de interacción con el material genético un metabolito del estireno (Kligerman *et al.*, 1992; Vaghef y Hellman, 1998). Los efectos genotóxicos de estireno parecen ser imputables al SO, dado el carácter electrofílico y altamente reactivo del anillo oxirano que conforma su estructura, ya que posee una elevada capacidad para unirse covalentemente a moléculas de alto peso molecular, como por ejemplo proteínas plasmáticas, hemoglobina, ácidos nucleicos, etc. Las consecuencias principales y más directas de esta unión son la formación de aductos, entre los que destaca el de la posición N-7 de la guanina (Marckzinsky *et al.*, 2000), que desestabilizan el enlace N-glucosídico que une la base nitrogenada a la desoxirribosa en el ADN, lo cual conduce a la pérdida espontánea de la base generando sitios apúricos o apirimidínicos y posteriormente roturas de cadena. De hecho, el SO ha demostrado capacidad para inducir aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas, micronúcleos y daño sobre el ADN (Scott y Preston, 1994; Laffon *et al.*, 2001a y 2002), y

para alterar la expresión de ciertos genes implicados en el control del ciclo celular y los procesos apoptóticos (Laffon *et al.*, 2001b).

## 2. GENOTOXICIDAD

La Toxicología Genética trata de proporcionar información esencial para el mantenimiento de la integridad del material genético a fin de prevenir o ralentizar la carcinogénesis, el desarrollo de enfermedades hereditarias o el envejecimiento (Kramer, 1998). Para ello estudia la genotoxicidad, que consiste en la caracterización y descripción de la acción de aquellos agentes que, a nivel subtóxico, provocan algún tipo de modificación en el material genético (Brusick, 1987). La acción de los agentes genotóxicos puede dar lugar a la inducción de cambios en la secuencia de ADN provocando la aparición de mutaciones puntuales, o más a gran escala, de aberraciones cromosómicas visibles. Las modificaciones en la cadena polinucleotídica a menudo producen la alteración o eliminación de la función génica.

Con objeto de evaluar la genotoxicidad de todos los agentes mutagénicos relevantes, hoy en día se recurre a la realización de una batería de tests tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que parece claro que ningún único ensayo es capaz de detectar todos los posibles agentes mutagénicos. Dos de los tests más ampliamente utilizados son el ensayo de micronúcleos y la prueba del cometa.

### 2.1. Ensayo de micronúcleos

Rieger *et al.* (1968) definieron un micronúcleo (MN) como «un núcleo adicional y separado del núcleo principal de una célula, producido durante la telofase de la mitosis o la meiosis a partir de cromosomas retrasados o de fragmentos cromosómicos derivados de cambios cromosómicos estructurales espontáneos o inducidos experimentalmente». Dado que los MN requieren de una primera división celular para ser expresados, este ensayo presentaba, en un primer momento, un inconveniente que venía dado por la respuesta variable de los linfocitos a la estimulación mitogénica y la presencia

de células en el cultivo que no experimentaban división y que, por tanto, no podían dar lugar a MN. Esta imprecisión en la determinación del número de ciclos celulares que habían completado las células portadoras de MN, interfería en el análisis microscópico y la obtención de frecuencias y resultados. Para solventarlo Fenech y Morley (1985) modificaron la técnica y desarrollaron el test de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN), en el que se adicionan a los cultivos bajas concentraciones de citocalasina-B. Dicho compuesto inhibe la citocinesis uniéndose a complejos de elevado peso molecular en la membrana plasmática, impidiendo su capacidad de inducción de polimerización de la actina y el ensamblaje de los microfilamentos necesarios para generar el surco de división. De este modo es posible la consideración y diferenciación por su aspecto binucleado de las células que se han dividido una única vez.

## **2.2. Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo del cometa)**

El ensayo del cometa es una técnica sencilla, rápida y sensible para analizar el daño en el ADN en células individuales. Su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena del ADN que contiene. En contraste, las células no dañadas presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola. Esto es debido a la migración de los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo, al ser sometida la célula a una diferencia de potencial durante una electroforesis. Es precisamente en eso en lo que radica el fundamento de la técnica; las células aisladas y expuestas al agente genotóxico son embebidas en una capa de agarosa y distribuidas sobre un portaobjetos, se lisan sus membranas por acción de un detergente y, tras llevar a cabo el proceso electroforético, se produce la migración del ADN en función del daño ocasionado sobre él por el compuesto químico.

Teniendo en cuenta que el estireno provoca la formación de aductos y la pérdida espontánea de bases nitrogenadas, que generan sitios apúricos o apirimidínicos, hemos considerado el ensayo del cometa en medio alcalino, como una buena alternativa para la cuantificación del daño sobre el ADN ocasionado por este compuesto.

### 3. SUSCEPTIBILIDAD INDIVIDUAL

Tras una exposición a un agente químico nocivo para la integridad genómica, todo organismo procede a la eliminación del mismo, con objeto de evitar en la medida de lo posible los potenciales perjuicios ocasionables. Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el proceso de eliminación se basan principalmente en distintas rutas metabólicas, que difieren entre ellas en el grado de complejidad y especificidad que presentan. En general incluyen distintos pasos y se considera que desempeñan un papel de vital importancia en la carcinogénesis debida a agentes químicos. De hecho, la mayoría de ellos adquieren su potencial carcinogénico tras una activación de índole enzimática llevada a cabo en estas rutas, durante la cual sustancias procarcinógenas son metabólicamente activadas a intermediarios electrofílicos genotóxicos, ocasionantes de daño en el ADN. Vista, por tanto, la importancia subyacente al proceso mencionado, parece necesaria la caracterización y el estudio del funcionamiento de las principales enzimas implicadas en el metabolismo xenobiótico. Con respecto a esto se conoce que muchos de los genes que codifican para ellas presentan carácter polimórfico, encontrándose alguno de estos polimorfismos ligado a cambios en la función o actividad catalítica de la proteína codificada. Esto condiciona la existencia de diferencias en la capacidad individual de biotransformación de mutágenos o carcinógenos ambientales y, por lo tanto, en la modulación de la extensión del daño genético inducido. Por todos los motivos mencionados, se considera que la estimación del riesgo asociado a la exposición a un agente genotóxico ha de ser evaluada teniendo en cuenta las características genotípicas, ya que éstas pueden determinar la susceptibilidad individual a ese agente en concreto.

Una enzima de biotransformación de gran importancia en la detoxificación de xenobióticos es la epóxido hidrolasa. Actúa catalizando la formación de trans-dihidrodiolés mediante la adición de moléculas de agua a epóxidos aromáticos y alifáticos, compuestos muy reactivos e inestables y con gran capacidad de unirse a las grandes macromoléculas orgánicas como el ADN, generando inestabilidad y posteriormente mutaciones. Estudios clínicos demuestran asociaciones entre niveles bajos de su actividad y respuestas adversas ante agentes químicos y estados de enfermedad, y en concreto ha

sido propuesta su relación con cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe y pulmón, así como con neoplasias ováricas (Jourenkova-Mironova *et al.*, 2000). El gen que codifica para esta enzima es el EPHX1, situado en el brazo largo del cromosoma 1. De los polimorfismos que afectan a este gen los más intensamente estudiados son dos y se localizan en los exones 3 y 4. Se trata de dos mutaciones puntuales que resultan en variaciones en residuos aminoacídicos de la proteína: el cambio Tyr113His originado por una mutación en el exón 3, y la modificación Arg139His debido a un cambio nucleotídico en el exón 4 del gen. Como consecuencia de ellas se obtiene una proteína funcionalmente alterada, ya que el primer cambio aminoacídico le confiere un incremento de un 50% en su tasa de actividad, mientras que el segundo de ellos provoca una disminución de un 25% (Hasset *et al.*, 1994).

Otras enzimas destacables por su importancia en este tipo de procesos son las pertenecientes a la familia de las glutatión S-transferasas (GST), consideradas clásicamente como parte de la defensa celular contra numerosas sustancias químicas dañinas producidas endógenamente o procedentes del ambiente, desempeñando un papel esencial de protección contra procesos de estrés oxidativo y productos electrofílicos, ya que se encargan de la conjugación de dichos compuestos con glutatión reducido (Autrup *et al.*, 1999). Tres genes de gran importancia, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, pertenecientes a esta familia presentan carácter polimórfico, que da lugar a alteraciones en la actividad catalítica de las enzimas para las que codifican:

— GSTP1: Se caracteriza por codificar la isoforma enzimática más abundante en los pulmones y por tanto de particular importancia en la detoxificación de carcinógenos inhalados. Dos son los codones afectados por polimorfismos, y los aminoácidos que codifican se encuentran en el sitio activo de unión a electrófilos de la enzima. Las variantes implican los cambios aminoacídicos Ile105Val, provocado por una transición en el nucleótido 313 del exón 5, y Ala114Val, resultante de una transición en la posición 314 del exón 6. Los alelos resultantes se clasifican como \*A (homocigoto salvaje para ambos *loci*), \*B (portador del cambio aminoacídico Ile105Val) y \*C (que presenta ambas mutaciones). Las proteínas codificadas por ellos poseen distinta estabilidad térmica y afinidad por el sustrato.



— **GSTM1**: Entre las posibles variantes que presenta destacan las caracterizadas por la presencia o ausencia de una delección, que fenotípicamente genera una proteína funcionalmente alterada con ausencia de capacidad catalítica en los casos en los que la delección está presente. Estudios epidemiológicos han propuesto que los individuos que portan genotipo nulo para este gen (ambos alelos delecionados) tienen un mayor riesgo de sufrir procesos cancerosos de pulmón, vejiga, colon y mama (Autrup, 2000).

— **GSTT1**: La enzima por él codificada cataliza la detoxificación de diversas sustancias como monohalometanos y óxido de etileno (Autrup, 2000). Al igual que en el caso anterior, el carácter polimórfico se debe a la presencia o ausencia de una delección que ocasiona la ausencia de actividad enzimática de la proteína. La enzima GSTT1 ha suscitado un gran interés desde que Pemble *et al.* en 1994 identificaron el alelo nulo, que además ha sido considerado como factor influyente en el riesgo de cáncer.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los cuatro genes mencionados, sus variantes polimórficas, y la actividad enzimática resultante de ellas.

TABLA 1. *Características genotípicas y actividad enzimática asociada*

Gen	Variante	Cambio aminoacídico	Influencia en la enzima
EPHX1	113 <sup>His</sup>	Tyr113His	Actividad baja
	139 <sup>Arg</sup>	His139Arg	Actividad alta
GSTP1	*B	Ile105Val	Alteración sustrato dependiente
	*C	Ile105Val+Ala114Val	
GSTM1	Nulo	Ausencia de proteína	Falta de actividad
GSTT1	Nulo	Ausencia de proteína	Falta de actividad

## OBJETIVOS

Numerosos factores relacionados con las características fisiológicas y hábitos de consumo de los individuos influyen en la respuesta de los mismos ante la acción de agentes genotóxicos. Además, las

deleciones o mutaciones en genes codificantes para ciertas proteínas que participan en el metabolismo del estireno se asocian con modificaciones en la actividad enzimática, y por tanto pueden ser responsables de la susceptibilidad individual a esta sustancia. Por todo ello, en este estudio se ha evaluado la influencia del sexo, edad, consumo de tabaco y de ciertos polimorfismos en las enzimas epóxido hidrolasa y glutathion *S*-transferasas sobre la inducción de daño genotóxico por parte del SO, sustrato directo de las mencionadas enzimas. En concreto, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluación del daño genotóxico inducido por el SO, tanto a nivel citogenético, mediante el test de MN, como a nivel de daño sobre el ADN, mediante el ensayo del cometa.
2. Determinación del efecto de ciertos factores fisiológicos, como el sexo, la edad y hábitos de consumo, como el tabaquismo, sobre la producción de efectos genotóxicos por parte del SO.
3. Analizar de la susceptibilidad individual ante la inducción de daño genotóxico por el SO asociada a ciertos polimorfismos en los genes EPHX1, GSTP1, GSTM1 y GSTT1, implicados en el metabolismo del estireno.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MUESTRAS Y SOLUCIONES DE TRATAMIENTO

Para llevar a cabo el estudio de genotoxicidad *in vitro*, se ha estimado el daño ocasionado sobre muestras de linfocitos de sangre periférica. Para ello se han realizado extracciones por venipunción de un total de 30 individuos.

El compuesto testado ha sido el SO (n° CAS 96-09-3) y se han utilizado dos concentraciones representativas: 50 y 200  $\mu\text{M}$ , ya que, basándonos en estudios previos (Laffon *et al.*, 2001a y 2002), consideramos 50  $\mu\text{M}$  como la dosis a partir de la cual se empiezan a detectar daños genotóxicos, y 200  $\mu\text{M}$  la dosis más elevada sin efectos determinantes sobre el crecimiento celular. Estas concentraciones se calcularon de forma que la solución de tratamiento constituyese un 1% del volumen total del medio de cultivo. Dada la

naturaleza oleosa del SO y su consecuente baja solubilidad en medio acuoso, se ha empleado como solvente para la preparación de las soluciones de tratamiento dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando este mismo al 1% como control negativo.

## 2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Los cultivos se establecieron por duplicado añadiendo 0.5ml de sangre a 4.5ml de medio de cultivo, se mantuvieron a 37°C y a las 24h se les añadió la solución de tratamiento correspondiente (DMSO, 50  $\mu$ M o 200  $\mu$ M). El ensayo se realizó como describen Laffon *et al.* (2001a). La tinción de los portaobjetos fue realizada con el colorante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5  $\mu$ g/ml. Todos los portaobjetos fueron codificados antes del análisis para evitar sesgos en los resultados provocados por la posible subjetividad del observador. Se contaron un total de 1000 células binucleadas por tratamiento y donante (500 de cada réplica), cuantificando el número de MN presentes en cada una de ellas.

## 3. ENSAYO DEL COMETA

El ensayo del cometa se ha desarrollado con 27 individuos, debido a que de 3 de los donantes utilizados no se obtuvo suficiente sangre heparinizada para llevar a cabo la extracción de leucocitos. El aislamiento de leucocitos mononucleares procedentes de sangre heparinizada se ha realizado mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll. El ensayo del cometa se ha llevado a cabo siguiendo lo descrito en Laffon *et al.* (2001a). Todos los portaobjetos fueron codificados y teñidos con 60  $\mu$ l de DAPI 5  $\mu$ g/ml. La captura de las imágenes fue realizada mediante el programa Leica QWIN (Leica Imaging Systems), evaluando como parámetro cuantitativo longitud de la cola del cometa (TL), medida desde el centro estimado del núcleo (Olive *et al.*, 1992). Se analizaron un total de 100 células por tratamiento y donante, 50 procedentes de cada una de las réplicas.

#### 4. GENOTIPADO

La extracción de ADN se ha realizado utilizando el kit *Puregene™ DNA isolation Kit* (Gentra Systems). Con objeto de obtener un mayor rigor en los resultados, todas las determinaciones genotípicas fueron realizadas, al menos, por duplicado.

Siguiendo las técnicas descritas por Smith y Harrison (1997) se han amplificado dos regiones del gen *EPHX1* para detectar por un lado una mutación en el exón 3, que ocasiona un cambio aminoacídico en el codon 113 de Tyr a His (*EPHX1-113<sup>His</sup>*), y por otro, una mutación en el exón 4 que provoca el cambio en el codon 139 de His a Arg (*EPHX1-113<sup>Arg</sup>*). Una vez determinadas las características individuales para los exones 3 y 4 y en función de éstas, hemos realizado una nueva clasificación de los individuos según la actividad epóxido hidrolasa esperada (Sarmanová *et al.*, 2000), en alta, media o baja.

Se han analizado dos exones (5 y 6) del gen *GSTP1* con objeto de detectar las posibles mutaciones *Ile105Val* (*GSTP1-105<sup>Val</sup>*) y *Ala114Val* (*GSTP1-114<sup>Val</sup>*), según el método descrito por Saarikoski *et al.* (1998). Las características de los alelos *GSTP1* en función de los aminoácidos que poseen en los codones 105 y 114 se muestra en la Tabla 2.

Con objeto de determinar los polimorfismos de delección relacionados con los genes *GSTM1* y *GSTT1* se llevó a cabo una amplificación múltiple por PCR, incluyendo como control interno un fragmento del gen de la  $\beta$ -globina, que garantiza el funcionamiento correcto de la amplificación, como describen Laffon *et al.* (2003).

TABLA 2. Características de los alelos del gen *GSTP1*

Denominación	Composición aminoacídica	
	Exón 5 (codon 105)	Exón 6 (codon 114)
<i>GSTP1</i> *A	Ile	Ala
<i>GSTP1</i> *B	Val	Ala
<i>GSTP1</i> *C	Val	Val

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como paso previo al análisis se ha evaluado la normalidad de todas las variables obtenidas en el estudio mediante el test de bondad de ajuste de Kolomogorov-Smirnov. Ninguna de ellas se apartaba significativamente de la distribución normal, por lo que se asumieron los tests paramétricos como adecuados para su utilización en el análisis de estos datos. Debido a que además las variables se adaptan a un diseño completamente aleatorizado se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) para la determinación estadística de los resultados, el cual complementado por los tests de rangos múltiples nos permitió determinar las diferencias significativas entre los distintos grupos analizados y de este modo estimar la influencia de los genotipos u otros factores (sexo, edad, consumo de tabaco) sobre la variabilidad interindividual de los biomarcadores analizados. La asociación de las variables frecuencia de MN y TL con la concentración de SO (relación dosis-respuesta) fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El nivel de significación fue fijado en 5%. Todos los análisis estadísticos han sido llevados a cabo mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 11.0 (Illinois, USA).

## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DONANTES

Determinados factores como características fisiológicas, hábitos de consumo y especialmente diferencias de tipo genético de los individuos pueden variar considerablemente la respuesta de los mismos ante agentes dañinos y genotóxicos. Por este motivo, un paso previo al estudio *in vitro* será la caracterización de los donantes y su estructuración en grupos de acuerdo con este tipo de factores determinantes. Se puede observar así que 19 de los 30 donantes han sido clasificados como no fumadores y 11 como fumadores. Estos últimos han sido diferenciados a su vez, teniendo en cuenta la cantidad de tabaco que consumen, resultando un primer grupo de fumadores moderados ( $\leq 10$  cigarrillos/día) integrado por 4 donantes y un se-

gundo grupo de fumadores intensivos (> 10 cigarrillos/día) constituido por 7 individuos. En relación al tiempo que llevan fumando, diferenciamos 7 fumadores recientes ( $\leq 5$  años fumando) y 6 fumadores veteranos (> 5 años fumando). En lo referente al sexo, existe una división homogénea entre varones y mujeres. Teniendo en cuenta la edad, 23 individuos son clasificados en el grupo de menor edad ( $\leq 30$  años) y 7 integran el grupo de mayor edad (> 30 años).

Con respecto a la variabilidad individual determinada por los polimorfismos estudiados en genes metabólicos, entre los individuos estudiados no se ha encontrado ningún homocigoto variante para ninguno de los *loci* analizados, con excepción del individuo 18, el cual presenta la alteración EPHX1-139<sup>Arg</sup>/EPHX1-139<sup>Arg</sup>. Si analizamos el número de individuos portadores de alteraciones en estos *loci* podemos observar que, en lo concerniente al gen EPHX1, 11 individuos presentan el genotipo EPHX1-113<sup>Tyr</sup>/EHPHX1-113<sup>His</sup> para el exón 3 y 10 el genotipo EPHX1-139<sup>His</sup>/EPHX1-139<sup>Arg</sup> para el exón 4. Así, desde el punto de vista de funcionalidad enzimática y siguiendo el criterio propuesto por Sarmanová *et al.*, (2000) hemos clasificado a 6 individuos con baja actividad esperada epóxido hidrolasa, 18 con actividad media y 6 con actividad elevada. Para el gen GSTP1 se pueden diferenciar 22 individuos GSTP1-105<sup>Ile</sup>/GSTP1-105<sup>Val</sup> para el exón 5, y 4 donantes GSTP1-114<sup>Ala</sup>/GSTP1-114<sup>Val</sup> para el exón 6, resultando así 8 individuos \*A/\*A, 18 \*A/\*B y 4 \*A/\*C (Tabla 2). En cuanto a GSTM1 y GSTT1, 13 de los donantes presentan genotipo nulo para el primero de ellos, y 6 individuos portan genotipo nulo para el segundo.

## 2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Tras la realización del análisis de los valores obtenidos en el ensayo de MN llevado a cabo sobre los 30 donantes, con 2 concentraciones distintas de SO (50 y 200  $\mu\text{M}$ ) y utilizando DMSO como control negativo, se detecta un incremento en la tasa promedio de MN conforme aumenta la concentración de SO a la que se han visto expuestos los cultivos, siendo este incremento estadísticamente significativo para la mayor parte de las células sometidas a la dosis de 200  $\mu\text{M}$  y en algunas de las expuestas a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Con respecto a la relación dosis-respuesta, el valor del coeficiente de

correlación de Pearson obtenido ha sido de 0.070, resultando significativo al nivel de 0.01.

TABLA 3. *Inducción de MN en linfocitos humanos, clasificados según características fisiológicas y hábitos de consumo individuales*

Donantes	N	MN (media±error estandar)		
		control	50 µM	200 µM
Todos los donantes	30	13.33±0.70	25.57±0.97 <sup>a</sup>	44.60±1.36 <sup>a</sup>
Consumo de tabaco				
<i>No fumadores</i>	19	14.94±0.92	24.58±1.21 <sup>a</sup>	45.47±1.75 <sup>a</sup>
<i>Fumadores moderados</i>	4	12.75±1.97	35.50±3.23 <sup>a,b</sup>	48.75±3.93 <sup>a</sup>
<i>Fumadores intensivos</i>	7	9.29±1.16	22.57±1.81 <sup>a</sup>	39.86±2.51 <sup>a</sup>
<i>Fumadores recientes</i>	5	9.80±1.48	32.00±2.72 <sup>a,b</sup>	42.20±3.24 <sup>a</sup>
<i>Fumadores</i>	6	11.17±1.44	23.33±1.99 <sup>a</sup>	43.83±2.85 <sup>a</sup>
Sexo				
<i>Varones</i>	15	14.67±1.03	25.67±1.42 <sup>a</sup>	45.27±1.97 <sup>a</sup>
<i>Mujeres</i>	15	12.00±0.93	25.47±1.33 <sup>a</sup>	43.93±1.86 <sup>a</sup>
Edad				
≤30 años	23	12.52±0.75	24.78±1.09 <sup>a</sup>	42.52±1.50 <sup>a</sup>
>30 años	7	16.00±1.67 <sup>c</sup>	28.14±2.16 <sup>a</sup>	51.43±3.08 <sup>a,c</sup>

a: diferencias significativas en relación a los cultivos control correspondientes.

b: diferencias significativas en relación a los no fumadores.

c: diferencias significativas en relación al grupo de menor edad.

Tomando como factor de agrupación las características fisiológicas y hábitos de consumo de los donantes, hemos obtenido los valores incluidos en la Tabla 3. En vista de los resultados, cabe comentar la ausencia directa de efecto del consumo de tabaco por parte de los donantes, tanto desde el punto de vista de cantidad consumida, como de tiempo de exposición, con excepción de los individuos clasificados como fumadores de baja intensidad y fumadores recientes sometidos al tratamiento de SO 50 µM, donde sí es observable un aumento significativo en la tasa de MN. Con respecto a la diferenciación por sexos de los individuos, no se observan diferencias significativas en las frecuencias de MN obtenidas tras el desarrollo del

ensayo. Al evaluar la posible influencia de la edad en la génesis de MN, se registran incrementos estadísticamente significativos en la tasa del parámetro estudiado en el grupo de individuos de mayor edad con respecto a los de menor edad.

Para un estudio más exhaustivo que nos ofrezca la posibilidad de obtención de conclusiones acerca de la influencia de los polimorfismos enzimáticos en la génesis de MN, hemos realizado un análisis de datos de manera agrupada en concordancia con las características genotípicas de los individuos para los 6 polimorfismos estudiados. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 4. Se observa que con respecto a la epóxido hidrolasa, los resultados no ponen de manifiesto diferencias significativas en la frecuencia de MN entre los individuos de actividad alta con respecto a los de actividad media. Sin embargo dicho valor sí se ve incrementado significativamente en todos los tratamientos para los donantes que presentan una baja actividad enzimática esperada. En lo que respecta al gen GSTP1, observamos que las tasas de MN aumentan en todas las dosis tanto

TABLA 4. *Influencia de los polimorfismos seleccionados en la inducción de MN por el SO*

Gen	Polimorfismo	Variantes	N	MN (media±error estándar)		
				control	50 µM	200 µM
EPHX1	exón 3 y exón 4	actividad elevada	6	12.67±1.44	25.33±2.21	38.50±2.68 <sup>a</sup>
		actividad media	18	12.33±0.85	23.06±1.16 <sup>a</sup>	43.94±1.75 <sup>a</sup>
		actividad baja	6	17.00±1.86 <sup>b</sup>	33.30±2.58 <sup>a,b</sup>	52.67±3.37 <sup>a,b</sup>
GSTP1	exón 5 y exón 6	*A/*A	8	12.88±1.31	22.88±1.75 <sup>a</sup>	41.25±2.48 <sup>a</sup>
		*A/*B	18	12.94±0.87	25.78±1.27 <sup>a</sup>	44.44±1.76 <sup>a</sup>
		*A/*C	4	16.00±2.25	30.00±2.92 <sup>a</sup>	52.00±4.04 <sup>a,c</sup>
GSTM1	delección	positivo	17	13.11±0.94	23.06±1.20 <sup>a</sup>	43.35±1.74 <sup>a</sup>
		nulo	13	13.63±0.40	28.85±1.60 <sup>a,d</sup>	42.23±2.16 <sup>a</sup>
GSTT1	delección	positivo	24	13.83±0.80	26.58±1.12 <sup>a</sup>	46.33±1.56 <sup>a</sup>
		nulo	6	11.33±1.37	21.50±1.93 <sup>a,d</sup>	37.67±2.71 <sup>a,d</sup>

a: diferencias significativas con respecto a los correspondientes cultivos control.

b: diferencias significativas con respecto al genotipo de actividad media.

c: diferencias significativas con respecto al genotipo salvaje en homocigosis.

d: diferencias significativas con respecto al genotipo positivo.



en los individuos con genotipo \*A/\*B como en los \*A/\*C, con respecto a los homocigotos \*A/\*A, alcanzando dicho parámetro la significación estadística en los cultivos de individuos con genotipo \*A/\*C expuestos a la concentración de SO más elevada. Para el gen GSTM1, únicamente las células portadoras del genotipo nulo provenientes de los cultivos expuestos a una concentración de SO de 50  $\mu$ M muestran un ligero aumento en las frecuencias de MN obtenidas. Por último, la respuesta de los individuos GSTT1 nulos ante los 3 tratamientos ensayados ha estado conformada por una disminución del valor del parámetro evaluado en todos los casos respecto a los individuos positivos, siendo significativa la diferencia en los cultivos tratados con SO.

Con objeto de eliminar la posible influencia del genotipo EPHX1 sobre el efecto de los genotipos GSTM1 y GSTT1, los individuos han sido agrupados según su actividad epóxido hidrolasa esperada. No se han detectado efectos directos del genotipo GSTM1 sobre la inducción de MN, exceptuando los cultivos expuestos a dosis de SO 50  $\mu$ M y procedentes de linfocitos de baja actividad enzimática epóxido hidrolasa y GSTM1 nulos, en los que se observa un incremento significativo en la tasa de MN. Debido a la ausencia de individuos GSTT1 nulos con baja actividad esperada epóxido hidrolasa, no se ha podido realizar la comparación en este grupo respecto a los portadores del gen GSTT1. En relación al genotipo GSTT1 nulo, se puede apreciar una disminución significativa en la frecuencia de MN obtenida para los linfocitos con elevada actividad epóxido hidrolasa, mientras que los de actividad media no presentan ninguna diferencia significativa con respecto a los GSTT1 positivos.

### 3. ENSAYO DEL COMETA

En este ensayo, la extensión de la migración del material génico hacia el ánodo durante la electroforesis es considerada como un indicador de la cantidad de roturas producidas en la cadena polinucleotídica (Singh *et al.*, 1988). Para ello, habitualmente se evalúan como parámetros cuantitativos del daño en el ADN la longitud de la cola del cometa (TL), el porcentaje de ADN que presenta en la cabeza y el momento de la cola (calculado como producto de las dos

magnitudes anteriores). Sin embargo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio sugieren la utilización de TL como estimador más riguroso del daño generado por el SO, ya que es el parámetro que presenta menor dispersión y mejor relación dosis-respuesta (Laffon *et al*, 2001a).

En base a los valores obtenidos en la realización de este ensayo es posible comentar que, paralelamente al incremento en la dosis de SO, y como consecuencia de él, se produce un aumento significativo en la longitud media de la cola del cometa, y por lo tanto un mayor índice de roturas de cadena sencilla en el ADN. De hecho el análisis estadístico realizado por separado para cada uno de los individuos demuestra que, en todos los casos para el tratamiento de 200  $\mu\text{M}$ , y en la gran mayoría (90%) para la dosis de 50  $\mu\text{M}$ , pueden ser aceptadas como significativas las diferencias respecto a los correspondientes controles, con un nivel de significación superior al 95%. Si además tenemos en cuenta la relación dosis-respuesta, obtenida mediante el coeficiente de correlación de Pearson con un valor de 0.446, debemos destacar que existe una correlación entre las dos variables significativa a un nivel de 0.01.

En la Tabla 5 se evalúa la posible influencia de las características fisiológicas y de consumo de los donantes consideradas más relevantes, sobre la longitud de la cola del cometa. En relación al consumo de tabaco no se aprecia efecto de este hábito sobre la inducción de daño en el ADN; cabe comentar únicamente la existencia de un incremento en el valor del parámetro estimativo para los leucocitos provenientes de fumadores recientes expuestos a una dosis de SO de 200  $\mu\text{M}$ , con respecto a los individuos que no presentan hábito de consumo de tabaco. Teniendo en cuenta la diferenciación entre sexos, se aprecia un menor valor de TL para los individuos integrantes del grupo de mujeres en aquellos cultivos expuestos a SO. Por último, en lo concerniente a la edad, existe un incremento del parámetro para los donantes clasificados en el grupo de mayor edad.

TABLA 5. Inducción de daño sobre el ADN por el SO en leucocitos humanos, clasificados según características fisiológicas y hábitos de consumo

Donantes	N	TL ( $\mu\text{m}$ , media $\pm$ error estandar)		
		control	50 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
Todos los donantes	27	48.56 $\pm$ 0.23	55.86 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	68.78 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
Consumo de tabaco				
<i>No fumadores</i>	18	49.97 $\pm$ 0.31	56.40 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	69.04 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
<i>Fumadores moderados</i>	4	43.68 $\pm$ 0.31	55.78 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	70.31 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>
<i>Fumadores intensivos</i>	5	47.40 $\pm$ 0.43	53.99 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	66.62 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>
<i>Fumadores recientes</i>	4	43.90 $\pm$ 0.36	54.70 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	74.27 $\pm$ 0.96 <sup>a,b</sup>
<i>Fumadores veteranos</i>	5	47.22 $\pm$ 0.41	54.85 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	63.45 $\pm$ 0.62
Sexo				
<i>Varones</i>	14	48.69 $\pm$ 0.33	56.58 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	70.01 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
<i>Mujeres</i>	13	48.42 $\pm$ 0.34	55.09 $\pm$ 0.44 <sup>a,c</sup>	67.46 $\pm$ 0.47 <sup>a,c</sup>
Edad				
$\leq 30$ años	21	46.65 $\pm$ 0.22	54.19 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	67.37 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
$> 30$ años	6	55.27 $\pm$ 0.66 <sup>d</sup>	61.70 $\pm$ 0.81 <sup>a,d</sup>	73.73 $\pm$ 0.83 <sup>a,d</sup>

a: diferencias significativas con respecto a los correspondientes cultivos control.

b: diferencias significativas con respecto a los no fumadores.

c: diferencias significativas con respecto a los varones.

d: diferencias significativas con respecto al grupo de menor edad.

Realizando el análisis de datos, considerando ahora como factor de agrupación las características genotípicas de los individuos, hemos obtenido los resultados que se muestran en la Tabla 6. Así, en lo que respecta al gen EPHX1, se detecta un incremento del valor de TL conforme disminuye la actividad epóxido hidrolasa esperada, alcanzando estas diferencias la significación estadística en los cultivos procedentes de individuos con baja actividad enzimática esperada. Para el gen GSTP1 únicamente se ha encontrado incremento en el parámetro estudiado en las células control de los individuos con genotipo \*A/\*C, en relación a los homocigotos \*A/\*A. Por último, tanto en los individuos con genotipo GSTM1 nulo como en los sujetos GSTT1 nullos, se aprecia una disminución significativa en el valor de TL respecto a aquellos individuos que portan los genotipos

positivos, tanto para los leucocitos control como para los tratados con SO.

TABLA 6. *Influencia de los polimorfismos genéticos seleccionados en el daño sobre el ADN inducido por el SO*

Gen	Polimorfismo	Variantes	N	TL ( $\mu\text{m}$ , media $\pm$ error estándar)		
				control	50 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
EPHX1	exón 3 y exón 4	actividad elevada	6	50.83 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	54.02 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	62.71 $\pm$ 0.64 <sup>a,b</sup>
		actividad media	16	47.46 $\pm$ 0.30	55.49 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	68.54 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
		actividad baja	5	49.37 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	59.25 $\pm$ 0.76 <sup>a,b</sup>	76.83 $\pm$ 0.98 <sup>a,b</sup>
GSTP1	exón 5 y exón 6	*A/*A	7	47.77 $\pm$ 0.45	55.70 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	73.36 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>
		*A/*B	17	48.01 $\pm$ 0.28	55.95 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	65.74 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
		*A/*C	3	53.57 $\pm$ 0.83 <sup>c</sup>	55.74 $\pm$ 0.89	75.33 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>
GSTM1	delección	positivo	15	49.09 $\pm$ 0.32	57.49 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	68.48 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
		nulo	12	47.90 $\pm$ 0.34 <sup>d</sup>	53.82 $\pm$ 0.44 <sup>a,d</sup>	69.16 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
GSTT1	delección	positivo	21	49.87 $\pm$ 0.28	57.45 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	70.84 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
		nulo	6	43.98 $\pm$ 0.27 <sup>d</sup>	50.29 $\pm$ 0.49 <sup>a,d</sup>	61.58 $\pm$ 0.57 <sup>a,d</sup>

a: diferencias significativas con respecto a los correspondientes cultivos control.

b: diferencias significativas con respecto al genotipo de actividad media.

c: diferencias significativas con respecto al genotipo salvaje en homocigosis.

d: diferencias significativas con respecto al genotipo positivo.

Del mismo modo que en el apartado anterior, para poder eliminar la posible interferencia de los genotipos EPHX1 en los resultados obtenidos para GSTM1 y GSTT1, realizamos una evaluación de los mismos previa agrupación de los individuos en base a su actividad epóxido hidrolasa esperada. A partir de ella se aprecia que el efecto del gen GSTM1 es poco claro, ya que muestra incrementos significativos del daño en el ADN en algunas de las muestras procedentes de individuos GSTM1 nulos y disminuciones del daño ocasionado en otras. Para los individuos GSTT1 nulos se detectan disminuciones en TL en aquellos que presentan actividad EH media; en el caso de los caracterizados por actividad EH elevada se observa un ligero descenso de TL para las células control e incremento en este parámetro en los leucocitos tratados con SO 200  $\mu\text{M}$ .

## DISCUSIÓN

El estireno, y más concretamente el SO, ha sido considerado clásicamente como uno de los principales factores determinantes de los niveles basales de daño sobre el ADN, ya que está presente de manera habitual en nuestro entorno formando parte de diversos plásticos, el humo del tabaco, envases de alimentos, etc., y es un compuesto que induce roturas cromosómicas, aneuploidía, intercambios entre cromátidas hermanas y micronúcleos (Scott y Preston, 1994). En general, se ha demostrado que los epóxidos provocan la alquilación de los nitrógenos del anillo imidazol en los nucleótidos, lo que conduce a inestabilidad del enlace N-glucosídico, apertura del anillo, pérdida de la base con la consecuente formación de sitios abásicos y roturas de cadena de ADN. La intensidad y cuantía de dichas lesiones pueden verse influenciadas por factores fisiológicos como edad, sexo y hábitos de consumo del individuo. Además, ciertos polimorfismos presentes en importantes enzimas metabólicas pueden causar variaciones interindividuales en el daño genotóxico inducido por agentes xenobióticos que son activados o detoxificados por ellas. Por ello se recomienda evaluar el riesgo individual teniendo en cuenta las características genéticas del sujeto, siendo por lo tanto de gran importancia la determinación genotípica en relación a dichas enzimas participantes en el metabolismo de xenobióticos en los estudios de poblaciones expuestas.

El motivo por el cual se ha realizado el estudio con SO, en lugar de estireno, radica fundamentalmente en que las enzimas codificadas por los genes evaluados en este trabajo actúan en un paso de la ruta metabólica posterior a la formación de SO por modificación del estireno; de este modo, al partir directamente de él se evita la posible variación interindividual ocasionada por los polimorfismos en genes codificantes para enzimas cuyo sustrato es el estireno como tal (citocromo P450), lo cual podría alterar los resultados. De hecho, estudios recientes sugieren que polimorfismos en los genes CYP1A1 y CYP2E21, pertenecientes a la familia citocromo P450, pueden afectar a la inducción de daño en el ADN en leucocitos humanos por parte del estireno (Laffon *et al.*, 2003).

Para evaluar el daño inducido por el SO, se han seleccionado dos ensayos de genotoxicidad: por una parte un test citogenético, que

refleja la capacidad clastogénica y/o aneugénica del compuesto, puesta de manifiesto en la génesis de MN, y por otra parte el ensayo del cometa, que proporciona información directa acerca del daño en el ADN generado en cada célula expuesta de manera individual. Este daño en el ADN se manifiesta en forma de roturas de cadena sencilla al exponer el material nuclear a un medio alcalino durante el desarrollo del ensayo. Las dosis de SO empleadas para tal fin han sido seleccionadas en función de estudios previos (Scott y Preston, 1994; Laffon *et al.*, 2001a).

En relación al test de MN, se ha detectado un incremento significativo en la frecuencia de MN en todos los tratamientos ensayados con respecto a los cultivos control, incremento que presenta correlación positiva con la concentración empleada, mostrando una buena relación dosis-respuesta, siendo el coeficiente de correlación de Pearson significativo a nivel de un 1%. Este hecho se observa de igual modo en el ensayo del cometa en el cual, a partir del total de datos obtenido y tras un análisis estadístico del mismo, se observa un incremento en el valor de TL relacionado con el aumento en la dosis de exposición de los cultivos. Al igual que en el test anterior, existe una buena relación dosis-efecto, al menos a las dosis ensayadas.

Teniendo en cuenta las características fisiológicas y hábitos de consumo de los donantes, se puede observar que, en lo que respecta al consumo de tabaco, no se ha detectado efecto directo de éste sobre la frecuencia de MN ni sobre TL, coincidiendo con los resultados presentados previamente en varios trabajos (Bolognesi *et al.*, 1997; Calvert *et al.*, 1998; Au *et al.*, 1998). Esta ausencia de daño adicional ocasionado por el consumo de tabaco puede ser debida al número de individuos analizado, ya que de los 30 donantes sometidos al estudio, tan sólo 11 de ellos eran fumadores, y de ellos únicamente 7 se podían clasificar como fumadores intensivos ( $\geq 10$  cigarrillos/día). Estudios posteriores permitirán aportar mayor número de datos que aseguren estas afirmaciones. Moller *et al.* (2000) sugieren que la existencia de discrepancias sobre el efecto del tabaco en algunos de los trabajos que utilizan el ensayo del cometa son debidas al bajo poder estadístico de los mismos, ya que el incremento de daño en el ADN en fumadores es pequeño. Por otra parte, Hellman *et al.* (1999) sugieren, en relación a la detección de daño por parte del ensayo del cometa, que las roturas de cadena sencilla

evaluadas mediante dicho ensayo no resultan un buen biomarcador de exposición al tabaco, y enfatizan que el tipo de daño que analiza este test (lugares álcali-lábiles y roturas de cadena sencilla) es rápida y eficientemente reparado, por lo que puede verse parcialmente enmascarado. Este hecho adquiere una mayor relevancia si tenemos presente que las células evaluadas en el ensayo del cometa son los leucocitos mononucleares, que engloban distintos tipos celulares (monocitos, linfocitos T y linfocitos B) con diferentes tasas de daño en el ADN y velocidades de reparación. Los monocitos son el tipo celular que presenta velocidad de reparación más elevada (Knudsen *et al.*, 1992), lo que implica que la detección de daño mediante el ensayo del cometa será menor en estas células.

En relación a la edad, se ha encontrado un mayor daño en las células procedentes de individuos pertenecientes al grupo de mayor edad en ambos tests, al igual que estudios previos realizados (Fenech *et al.*, 1999; Peace y Succop, 1999), lo cual no carece de fundamento ya que dicho factor es considerado como un elemento determinante de la eficacia de reparación de lesiones genéticas (Kirkwood, 1988).

Los resultados referentes a la influencia del sexo se muestran poco clarificadores, ya que únicamente es posible detectar un ligero incremento en la frecuencia de MN, no significativa desde el punto de vista estadístico, en el grupo de varones con respecto al de mujeres, efecto similar al puesto de manifiesto por Betti *et al.* (1994). Este hecho puede ser consecuencia de la pérdida preferente, asociada a la edad, del cromosoma X en la formación de MN en mujeres, tal como indican estudios previos (Hansen y Olsen 1994; Cantor *et al.*, 1995). En el ensayo del cometa los resultados son similares; este incremento de daño en varones con respecto al sexo opuesto ha sido también detectado en otro tipo de exposiciones, como por ejemplo a radiaciones (Kruszewski *et al.*, 1998).

Partiendo de la base de que cada persona posee su propia huella genética individual de alelos codificantes para enzimas metabólicas (Nebert, 1997), se ha procedido a la realización de un análisis por separado de cada uno de los cuatro genes codificantes para enzimas que participan en la ruta de detoxificación del estireno considerados, para tratar de esclarecer la existencia de un efecto influyente de

estas enzimas sobre el daño ocasionado en el material génico por parte del mencionado agente xenobiótico.

En lo que respecta a la epóxido hidrolasa, las modificaciones en su eficiencia catalítica han sido atribuidas a alteraciones en los exones 3 y 4, concretamente a los codones 113 y 139 respectivamente. Así, cuando el exón 3 se encuentra mutado la actividad enzimática de la proteína por él codificada se ve disminuida, y cuando la mutación afecta al exón 4 la actividad catalítica se ve incrementada (Sarmanová *et al.*, 2000). Ya que la epóxido hidrolasa participa en el proceso de detoxificación del SO, parece lógico pensar que a medida que disminuye su capacidad catalítica, como consecuencia de las mutaciones antes mencionadas, se verá incrementada la tasa de daño producido por este compuesto. Esto puede verse reflejado en los datos obtenidos como un incremento en la tasa de MN paralelo a la disminución de la actividad catalítica de la enzima, alcanzándose la significación estadística en los cultivos de células que presentan actividad epóxido hidrolasa baja con respecto a los de actividad media, tanto al ser expuestos a la dosis de 50 como de 200  $\mu\text{M}$ . De igual modo, los resultados proporcionados por el ensayo del cometa apuntan a un incremento en el valor de TL en ambos tratamientos aplicados conforme disminuye la actividad catalítica de la enzima. Al igual que en el ensayo de MN, estas diferencias son más marcadas y significativas estadísticamente en el caso de las células con actividad catalítica baja, en relación a las de actividad media. La explicación más plausible se basa en la influencia del efecto cuantitativo de las alteraciones enzimáticas: la mutación en el exón 3 confiere un incremento de la actividad catalítica de un 50%, mientras que la mutación en el exón 4 proporciona una disminución en la actividad enzimática de un 25% (Hasset *et al.*, 1994), por lo que será más sencilla la detección de la influencia de los polimorfismos en el primer caso que en el segundo de ellos.

El gen GSTP1 codifica para la isoforma enzimática más abundante en los pulmones, por lo que adquiere una particular importancia en la detoxificación de compuestos xenobióticos volátiles como el estireno (Saarikoski *et al.*, 1998). Ambas regiones peptídicas afectadas por el polimorfismo se encuentran en el dominio de unión al sustrato de la enzima, y por tanto la alteración de la cinética de reacción está inducida por cambios en la estructura tridimensional



(Ali-Osman *et al.*, 1997). Ambos polimorfismos derivan en proteínas que presentan diferente estabilidad térmica y afinidad por el sustrato (Sarmanová *et al.*, 2000). En este estudio se han puesto de manifiesto incrementos en la frecuencia de MN para los individuos caracterizados como heterocigotos \*A/\*B y \*A/\*C, en relación a los homocigotos salvajes. Esto puede ser debido a la baja actividad detoxificadora de la enzima producida por una alteración en la afinidad por el SO. Evaluando el valor de TL se observa de igual modo un incremento de dicho parámetro, y por tanto del daño sobre el ADN, pero únicamente en los cultivos control procedentes de individuos clasificados como \*A/\*C. El hecho de que las diferencias no sean muy marcadas puede estar relacionado con la ausencia de individuos homocigotos para los dos genotipos mutantes, en los cuales el incremento de la susceptibilidad al agente genotóxico debería verse más acentuado. Por otra parte, nuestros resultados se muestran concordantes con los presentados por Vodicka *et al.* (2001), que describen incremento en la frecuencia de mutación en el gen HPRT en una población de trabajadores expuestos a estireno, íntimamente relacionado con el genotipo heterocigoto para GSTP1 (exón 5, presente en los alelos \*B y \*C). El hecho de que el incremento de daño genotóxico en individuos heterocigotos \*A/\*B y \*A/\*C sea detectado con mayor intensidad en el test de MN respecto al ensayo del cometa puede estar relacionado con el diferente tipo de daño evaluado en ambos tests. Así, mientras que el ensayo del cometa pone de manifiesto lesiones primarias en el ADN susceptibles de reparación por escisión, los tests citogenéticos analizan lesiones fijadas en el ADN que ya han sido transformadas en modificaciones cromosómicas estructurales (Van Goethem *et al.*, 1997). Además, el tiempo de exposición a SO es mayor en el test de MN (40h) que en el ensayo del cometa (tan sólo 30min). Estas razones justifican que el test de MN pueda revelar pequeñas diferencias en el daño inducido, imposibles de detectar por medio del ensayo del cometa.

El análisis de los datos procedentes de ambos ensayos efectuados tras clasificar a los individuos en base a su genotipo GSTM1 y GSTT1 proporciona resultados contradictorios, ya que en ambos casos la frecuencia de MN obtenida, así como los valores de TL se ven incrementados con la delección del gen, lo que no parece congruente con la supuesta actividad detoxificadora de las enzimas codificadas por di-

chos genes. Estudios previos han descrito un incremento en el daño citogenético (tomando como variable respuesta los intercambios entre cromátidas hermanas) inducido por el SO relacionado con los genotipos nulos para GSTT1 (Üskula *et al.*, 1995), pero no para GSTM1 (Ollikainen *et al.*, 1998). Sin embargo, Shield y Sanderson (2001) obtuvieron que las células procedentes de individuos portadores de delección en el gen GSTM1 eran ligeramente más sensibles a la toxicidad por SO que las que presentan el gen completo, y que la presencia o ausencia de delección en GSTT1 no se correlaciona con la inducción de daño por dicho agente. Hay que tener en cuenta, no obstante, que los trabajos mencionados han sido llevados a cabo con 10 y 12 individuos y 5 líneas celulares respectivamente, por lo que su poder estadístico debe ser menor que el de nuestro estudio con 30 individuos, el cual apunta a que ninguno de los dos genes está asociado a un mayor riesgo genotóxico frente al SO. Por otra parte, Seidegard y Ekström (1997) sostienen que las enzimas codificadas por los genes GSTT parecen importantes en la protección contra hidroperóxidos, lo que puede ser relevante si tenemos en cuenta que el daño detectado en el ADN tras la exposición a SO puede ser ocasionado debido a procesos celulares de estrés oxidativo.

Con objeto de incrementar la sensibilidad del análisis y establecer la influencia de los genotipos GSTM1 y GSTT1 sobre el daño genotóxico inducido por el SO, se ha procedido a una evaluación de los resultados tomando como factor de agrupación las características de actividad epóxido hidrolasa individuales, para de este modo minimizar una importante fuente de variación intragrupo, ya que dicha enzima cataliza el principal paso de detoxificación de la ruta. Tanto en el caso de GSTM1 como en el de GSTT1, los resultados obtenidos son poco claros y homogéneos, ya que no se aprecian tendencias constantes ni uniformes: si bien en algunos casos el daño sufrido sobre el ADN y la frecuencia de MN obtenida es superior en células con genotipo positivo para GSTM1 o GSTT1, en otras ocasiones es a la inversa, como por ejemplo para las células clasificadas como con actividad epóxido hidrolasa elevada en todos los casos de tratamiento. En general se observa una ligera tendencia de disminución del daño sobre el material génico asociado a la presencia de genotipos nulos para estos genes, o bien ausencia de diferencias significativas, para todos los grupos establecidos según su actividad

epóxido hidrolasa esperada. La principal explicación para la controversia que presentan en este aspecto los datos obtenidos se basa en que la ruta de conjugación con glutathione representa un paso minoritario en el metabolismo de detoxificación de este compuesto, constituyendo tan sólo un 1% del total (Ghittori *et al.*, 1996). Por otra parte, cierta capacidad genotóxica ha sido atribuida a uno de los derivados de la conjugación de SO con glutathione, la N-acetil-S-(1,2-fenil-2-hidroxietil)-cisteína (Zhang *et al.*, 1993). Por tanto, la presencia de enzimas de conjugación podría conducir a la acumulación en el medio de cultivo de derivados genotóxicos, con el consecuente incremento del daño en comparación con las células que no expresan dichas enzimas. Además hay que tener en cuenta que al proceder a la subdivisión de los donantes en los distintos grupos generados por las diferencias en su actividad epóxido hidrolasa esperada, el número de individuos en cada grupo se ve reducido. En cualquier caso Vodicka *et al.* (2001) en el previamente mencionado estudio con trabajadores expuestos a estireno, tampoco detectan daño adicional generado por una sensibilidad de índole genotípica relacionado con deleciones en estos dos genes.

## CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo ha permitido obtener las conclusiones que se detallan a continuación:

1. El SO induce incrementos significativos en el daño genotóxico en leucocitos humanos a dosis superiores a 50  $\mu\text{M}$ , tanto a nivel citogenético como a nivel de daño en el ADN.
2. Existe una clara relación dosis-respuesta positiva para ambos tipos de daño evaluados, en el rango de dosis empleado.
3. La tasa de MN y el daño en el ADN inducidos por el SO se ven influenciados por la edad del individuo; sin embargo no se ha observado influencia del consumo de tabaco, resultando poco claro el efecto del sexo.
4. La genotoxicidad producida por el SO se relaciona de forma inversa con la actividad enzimática epóxido hidrolasa esperada, calculada en base a los alelos EPHX1-113 y EPHX1-139.

5. Se ha observado ligero incremento en el daño genotóxico inducido por el SO relacionado con los genotipos GSTP1 \*A/\*B y \*A/\*C.

6. El análisis del efecto causado por el polimorfismo de delección en los genes GSTM1 y GSTT1 sobre la toxicidad genética del SO muestra resultados contradictorios, debido probablemente al papel minoritario que estas enzimas desempeñan en el metabolismo de esta sustancia.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) ALI-OSMAN, F. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10004-10012.
- (2) AU, W.W. *et al.* (1998) *Mutat. Res.* 400: 467-478.
- (3) AUTRUP, H. *et al.* (1999) *Environ. Health Perspect.* 107: 233-238.
- (4) AUTRUP, H. (2000) *Mutat. Res.* 464: 65-76.
- (5) BETTI, C. *et al.* (1994) *Mutat. Res.* 307: 323-333.
- (6) BOLOGNESI, C. *et al.* (1997) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6: 249-256.
- (7) BOND, G.G. *et al.* (1992) *Scand. J. Work Environ. Health* 18: 145-154.
- (8) BOND, J.A. (1989) *Crit. Rev. Toxicol.* 19: 227-249.
- (9) BRUSICK, D.J. (1987) *Mutat. Res.* 189: 1-6.
- (10) CALVERT, G.M. *et al.* (1998) *Mutat. Res.* 417: 115-128.
- (11) CANTOR, K.P. *et al.* (1995) *J. Occup. Environ. Med.* 37: 336-348.
- (12) FENECH, M. Y MORLEY, A.A. (1985) *Mutat. Res.* 147: 29-36.
- (13) FENECH, M. *et al.* (1999) *Mutat. Res.* 428: 271-283.
- (14) GHITTORI, S. *et al.* (1996) *Am. J. Ind. Med.* 31:636-644.
- (15) HANSEN, J. Y OLSEN, J.H.O. (1994) *Scan. J. Work. Environ. Health.* 20: 22-6.
- (16) HASSET, C. *et al.* (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3: 421-428.
- (17) HELLMAN, B. *et al.* (1999) *Mutat. Res.* 442: 121-132.
- (18) JOURENKOVA-MIRONOVA, N. *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60: 534-536.
- (19) KESHAVA, N. Y ONG, T. (1999) *Mutat. Res.* 437: 175-194.
- (20) KIRKWOOD, T.B.L. (1988) *Mutat. Res.* suppl: 7-13.
- (21) KLIGERMAN, A.D. *et al.* (1992) *Mutat. Res.* 280: 35-43.
- (22) KNUDSEN, L.E. *et al.* (1992) *Carcinogenesis* 13: 1285-1287.
- (23) KRAMER, P.J. (1998) *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 395-405.
- (24) KRUSZEWSKI, M. *et al.* (1998) *Mutat. Res.* 416: 37-57.
- (25) LAFFON, B. *et al.* (2001a) *Mutat. Res.* 491: 163-172.
- (26) LAFFON, B. *et al.* (2001b) *Mutagenesis* 16: 127-132.
- (27) LAFFON, B. *et al.* (2002) *Toxicol. Lett.* 126: 61-68.
- (28) LAFFON, B. *et al.* (2003) *Toxicology* 186: 131-141.
- (29) MARCZYNSKI, B. *et al.* (2000) *Medical Hypotheses* 54: 619-623.
- (30) MATANOSKI, G.M. *et al.* (1990) *Environ. Health Perspect.* 86: 107-117.
- (31) MOLLER, P. *et al.* (2000) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 1005-1015.

- (32) NEBERT, D.W. (1997) *Am. J. Hum. Genet.* 60:.
- (33) NEWHOOK, R. *et al.* (1994) *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* C12: 453-471.
- (34) OLLIKAINEN, T. *et al.* (1998) *Environ. Mol. Mutagen.* 31: 311-315.
- (35) PEACE, B.E. Y SUCCOP, P. (1999) *Mutat. Res.* 425: 225-230.
- (36) RIEGER, R.A. *et al.* (1968) *A glossary of genetics and cytogenetics*, 3<sup>rd</sup> Edition. Allen and Unwin. London.
- (37) SAARIKOSKI, S.T. *et al.* (1998) *Int. J. Cancer* 77: 516-521.
- (38) SANTOS-BURGOA, C. *et al.* (1992) *Am. J. Epidemiol.* 136: 843-854.
- (39) SARMANOVÁ, J. *et al.* (2000) *Pharmacogenetics* 10: 781-788.
- (40) SCOTT, D. Y PRESTON, R.J. (1994) *Mutat. Res.* 318: 175-203.
- (41) SEIDEGARD, J. Y EKSTRÖM, G. (1997) *Environ. Health Perspect.* 105: 791-799.
- (42) SHIELD, A.J. Y SANDERSON, B.J.S. (2001) *Environ. Mol. Mutagen.* 37: 285-289.
- (43) SMITH, C.A.D. Y HARRISON, D.J. (1997) *Lancet* 350: 630-633.
- (44) UUSKÜLA, M. *et al.* (1995) *Carcinogenesis* 16: 947-950.
- (45) VAGHEF, H. Y HELLMAN, B. (1998) *Pharmacol. Toxicol.* 83: 69-74.
- (46) VAN GOETHEM, F. *et al.* (1997) *Mutat. Res.* 392: 31-43.
- (47) VODICKA, P. *et al.* (2001) *Mutat. Res.* 482: 89-103.
- (48) ZHANG, X. *et al.* (1993) *Mutat. Res.* 302: 213-218.