

Estudio citogenético de seguimiento de pescadores expuestos al fuel vertido por el petrolero Prestige

Memoria presentada por
Kristín Hildur Kristjánsdóttir

Para optar al título de
Doctor en Biología Celular

Este Trabajo ha sido realizado en la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección de las **Dras. Carme Fuster Marqués y Cristina Templado Meseguer**

Carme Fuster Marqués

Cristina Templado Meseguer

Kristín H. Kristjánsdóttir

Bellaterra, 4 de junio de 2012

Este trabajo se ha realizado con financiación de:

Sociedad Española de Neurología y cirugía Torácica (SEPAR)

Centro respira de Investigación (CRI) y Red Respira (RTIC 03/11)

CIRIT (Generalitat de Catalunya) Suport a grups de recerca (2009SGR-1107)

Fondo de Investigación Sanitaria, FIS (PI03/1685 y PI07/0086)

Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias y de Neoplasia Torácica (CIBERES)

CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

Servicio de Salud Gallego (SERGAS)

Generalidad de Catalunya, beca predoctoral 2009 FI-00312

Til einróð fjölskyldu minni

Resumen

En 2002, el petrolero Prestige se hundió vertiendo una gran cantidad de fuel que poco después llegó a las costas gallegas. En las tareas de limpieza del fuel colaboraron un gran número de personas que se expusieron a los compuestos químicos potencialmente tóxicos y algunos, como el benceno, carcinógenos. En un estudio genotóxico realizado dos años después de la exposición al fuel, por nuestro grupo (Prestige I), se observó un incremento de alteraciones cromosómicas estructurales en los individuos expuestos. Las conclusiones de este estudio evidenciaron la importancia de realizar un estudio de seguimiento de los mismos individuos a más largo plazo (Prestige II), dada la asociación existente entre aumento de alteraciones cromosómicas y riesgo a desarrollar cáncer. El objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar si el efecto genotóxico detectado persiste transcurridos 4 años del estudio anterior. Para ello se han estudiado 105 pescadores gallegos expuestos (E) y no expuestos (NE) al fuel. Además, 9 individuos se han incluido en un grupo especial de cáncer. Se han llevado a cabo cultivos convencionales de linfocitos de 72h en medio RPMI-1640. En total se han analizado 11.651 metafases con tinción secuencial uniforme-bandas G y 3.130 cariotipos para la detección de lesiones cromosómicas y alteraciones cromosómicas estructurales, respectivamente. La frecuencia de lesiones cromosómicas observada es similar en individuos expuestos y no expuestos en ambos estudios (Prestige I y Prestige II), indicando que las lesiones cromosómicas no son un buen biomarcador para analizar el efecto del fuel, si este ya no está presente. Se ha detectado una frecuencia elevada de alteraciones cromosómicas estructurales en individuos E, indicando que el efecto genotóxico detectado anteriormente aún persiste 4 años después y que las células de la médula ósea podrían haber sido afectadas por la exposición al fuel. Así mismo, la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales en individuos no expuestos era mayor que la observada en el Prestige I, lo que hace pensar que dichos individuos han estado sometidos, durante estos años, a una exposición indirecta al fuel de menor intensidad. Los individuos diagnosticados de cáncer presentan una frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales similar a la observada en individuos expuestos al fuel en Prestige II. Estos datos muestran la necesidad de hacer un seguimiento de los individuos que estuvieron muy expuestos al fuel, con el fin de detectar el cáncer en etapas más tempranas. Los estudios de genotoxicidad del Prestige I y II son, hasta el momento, los únicos que han analizado la exposición aguda al fuel en un elevado número de individuos muy seleccionados, a medio y largo plazo (2 y 6 años después de la exposición).

Summary

In 2002 the oil tanker Prestige wrecked near the Spanish region of Galicia, in the northwestern Atlantic coast of Spain. A big quantity of oil was spilt and reached the nearby coast soon after. An important amount of people took part in the cleaning tasks of the fuel and were therefore exposed to potentially toxic chemicals, some of them being carcinogens, as it is the case of benzene. A genotoxic study, carried out by our group (Prestige I) 2 years after the exposure to the fuel, showed an increase in structural chromosome aberrations in the exposed individuals. The conclusions from that study revealed the importance of conducting a follow up study of the same individuals in a longer term period (Prestige II), due to the existing association between the increase of chromosome aberrations and the risk of developing cancer. The main objective of this doctoral thesis is to determine if the genotoxic effect detected in these individuals persist four years after the previous study, by analyzing 105 fishermen, exposed (E) and not exposed (NE) to the fuel. Furthermore, 9 individuals have been included in a special cancer group. Conventional culturing of 72-hour lymphocytes in RPMI-1640 medium was carried out. A total of 11.651 metaphases were analysed sequentially stained, uniform- G-bands, and 3.130 karyotypes in order to detect chromosome lesions (gaps and breaks) and structural chromosome aberrations respectively. The observed frequency of chromosome lesions is similar in both groups exposed and not exposed, in both studies (Prestige I and Prestige II), indicating that chromosome lesions are not a good biomarker to analyse the fuel effect, when the fuel is not longer present. An elevated amount of structural chromosome aberrations has been detected in exposed individuals, which indicates that the genotoxic effect previously observed still persists four years later, and that the cells of the bone marrow could have been affected due to the exposure to the fuel. Moreover, the frequency of structural chromosome aberrations in not exposed individuals has been greater than observed in Prestige I, which makes us believe that these individuals have undergone, during these years, a less intense and indirect exposure to the fuel. The individuals diagnosed with cancer present a frequency in structural chromosome aberrations similar to the observed in individuals exposed to the fuel in Prestige II. Such data proves the need for following up of the most exposed individuals, aiming to detect cancer in the initial stages. The genotoxic studies in Prestige I and II are, so far, the only studies that have analysed the acute exposure to the fuel in an important quantity of well chosen individuals, in a medium and long-term period (2 and 6 years after the exposure).

Abreviaturas

Ace	Fragmento acéntrico
Apc	Afidicolina
CA	Alteraciones cromosómicas
CCD	Charge coupled device
Chr	Cromosoma
Chsb	Rotura de cromosoma
Chsg	Gap de cromosoma
Cht	Cromátide
Chtb	Rotura de cromátide
Chtg	Gap de cromátide
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CMML	Leucemia mielomonocítica crónica
CNV	Copy number variance
COV	Compuestos orgánicos volátiles
Cyt-B	Cytocalacina B
Del	Delección
DS	Duplicaciones segmentarias
DSB	Double strand break
E	Expuestos
EPA	Environmental protection agency
FS	Lugar frágil
FSM	Fragile site multinomial method
GEE	Ecuaciones de estimación generalizada

HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Interval de confiaca
ISCN	International Standing Comité on Human Cytogenetic Nomenclatura
LCR	Low copy repeat (duplicaciones segmentarias)
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNH	Linfoma no-Hodgkin
LRB	Longitud relativa de bandas
SP	Sangre periférica
SCE	Sister chromatid exchange
Mar	Cromosoma marcador
MM	Micronúcleos
MO	Medula ósea
NE	No expuestos
OR	Odds ratio
R	Ring (anillo)
Rob	Robertsoniana
SEPAR	Sociedad Española de Neumología cirugía Torácica
SSB	Single strand break
T	Translocación
V	Voluntarios

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Complejidad del genoma humano	3
1.2. Inestabilidad genómica	4
1.2.1. Puntos calientes susceptibles a roturas	5
1.3. Lesiones y alteraciones cromosómicas estructural	8
1.4. Alteraciones cromosómicas como biomarcador de genotoxicidad	10
1.5. Agentes químicos genotóxicos.....	13
1.6. La catástrofe del petrolero Prestige	16
1.7. Efecto de la exposición al fuel vertido en la salud	17
1.8. El proyecto SEPAR-Prestige	20
1.8.1. Estudio Inicial: Prestige I	20
1.8.2 Estudio de seguimiento: Prestige II	21
2. Objetivos	23
3. Material y métodos	27
3.1. Individuos incluidos en el estudio	29
3.2. Tipo y transporte de muestras	29
3.3. Procesado de muestras: Cultivo de linfocitos	31
3.4. Tinción secuencial uniforme-bandas G	34
3.5. Análisis citogenético	35
3.6. Análisis estadístico	37
3.7. Individuos con cáncer	40

4. Resultados	43
4.1. Características de los individuos del estudio de seguimiento	45
4.2. Análisis citogenético	48
4.2.1. Análisis de metafases con tinción uniforme	48
4.2.2. Análisis de metafases con bandas G	50
4.2.3. Identificación de polimorfismos cromosómicos	53
4.2.4. Asociación entre exposición y daño cromosómico: Efecto “dosisrespuesta”	54
4.3. Cromosomas y bandas cromosómicas afectadas por la exposición al fuel	57
4.3.1. Cromosomas y brazos cromosómicos	57
4.3.2. Bandas cromosómicas	59
4.4. Resultados citogenéticos obtenidos en Prestige I y Prestige II	61
4.4.1. Estudio global de seguimiento	61
4.4.2. Estudio de Seguimiento en los mismos individuos	64
4.4.3. Asociación entre exposición al fuel y daño cromosómico en Prestige II versus Prestige I	67
4.4.4. Cromosomas y bandas cromosómicas más afectadas en Prestige II y Prestige I	68
4.5. Individuos con cáncer	68
4.5.1. Lesiones cromosómicas	69
4.5.2. Alteraciones cromosómicas estructurales	69
4.5.3. Cromosomas y bandas cromosómicas	70
5. Discusión	73
5.1 Relevancia del estudio de seguimiento Prestige II	75
5.2 Características de la población estudiada en el Prestige II	76

5.3. Efecto genotóxico causado por exposición aguda al fuel	79
5.3.1. Prestige I y II versus otros estudios genotóxicos de la exposición al fuel	80
5.4. Comparación de resultados citogenéticos del Prestige II y Prestige I	82
5.4.1. Frecuencia y tipo de daño cromosómico: Estudio de seguimiento	82
5.4.2. Asociación entre exposición al fuel y daño cromosómico	86
5.4.3. Cromosomas y bandas cromosómicas más afectadas por la exposición aguda al fuel	86
5.5. Consecuencias de la exposición al fuel en pacientes afectados de cáncer	91
6. Conclusiones	95
7. Bibliografía	99
8. Anexos	
9. Agradecimientos	

1. Introducción

1.1. Complejidad del Genoma Humano

El genoma humano está constituido por unos 3000 millones de pares de nucleótidos, distribuidos en 24 cromosomas diferentes que contienen aproximadamente 23000 genes. Además de los genes, el genoma posee regiones espaciadoras, regiones reguladoras, restos de genes antiguamente funcionales y secuencias con funciones todavía desconocidas.

La variación genética del genoma humano abarca desde cambios de un solo nucleótido hasta grandes alteraciones a nivel cromosómico detectables al microscopio óptico. La variabilidad genómica incluye variaciones en la secuencia del DNA y diferencias tanto estructurales como cuantitativas (Fig. 1) (Gonzaga-Jauregui *et al.*, 2012).

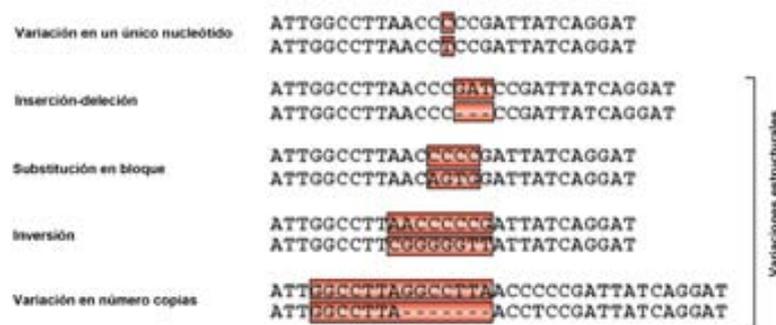


Figura 1. Diferentes clases de variabilidad genómica: Cambios en un solo nucleótido, inserción-delección de uno o más nucleótidos, sustituciones en bloques, inversiones, variaciones en el número de copias (CNV) (Frazer *et al.*, 2009).

En los últimos años, el estudio del genoma humana ha puesto de manifiesto que la variabilidad genómica es más el resultado de variaciones estructurales, es decir cambios de posición y orientación de secuencias de DNA, que de cambios puntuales de nucleótidos. La variabilidad cuantitativa del genoma conocida como variaciones en el número de copias (CNV, *copy number variants*) (duplicaciones y deleciones) aporta gran parte del polimorfismo genómico. Se estima que cada individuo tiene aproximadamente 1000 CNV polimórficas que varían en tamaño de 500 bp a 1.2 Mb (Alkan *et al.*, 2011; Cooper *et al.*, 2011; Gonzaga-Jauregio *et al.*, 2012.). La distribución de las CNVs en el genoma no es uniforme, acumulándose en los llamados “puntos calientes”, situados en las regiones teloméricas, centroméricas y ricas en genes (Cooper *et al.*, 2007). En células cancerosas se ha observado una mayor frecuencia de CNV, lo que sugiere que, en este tipo de células, existe una alta tasa de mutación *de novo* (Arlt *et al.*, 2012).

Dentro de la variabilidad cuantitativa del genoma encontramos un tipo específico de duplicaciones, conocidas como duplicaciones segmentarias (DS) ó *low copy repeat* (LCRs). Estas duplicaciones corresponden a fragmentos de DNA con un tamaño >1 kb que comparten un elevado grado de homología (>90%) presentes, como mínimo, dos veces en el genoma haploide y separados por >1Mb (Bailey *et al.*, 2002). Es importante destacar la existencia de una fuerte asociación entre la localización de las DS y regiones de inestabilidad cromosómica (Sharp *et al.*, 2005; Puliti *et al.*, 2010). Así pues, el conocimiento de los mecanismos que originan las variaciones estructurales contribuye a predecir las regiones más inestables y susceptibles a sufrir reorganizaciones cromosómicas. Estos mecanismos son comunes a los que originan alteraciones cromosómicas estructurales que afectan a regiones cromosómicas de mayor tamaño (3-5Mb) visibles al microscopio óptico (Gu *et al.*, 2008).

1.2. Inestabilidad genómica

Conservar la estabilidad del genoma a lo largo del tiempo es sumamente difícil puesto que el genoma constantemente se encuentra sometido a la acción de diferentes factores, externos e internos, que afectan su integridad (Fig. 2). Las roturas más frecuentes del DNA causadas por estos factores son las de doble cadena (*double stranded breaks*, DSB) que constituyen una de las formas más citotóxicas, dado que son el origen de reorganizaciones cromosómicas que pueden comprometer la viabilidad celular (Finn *et al.*, 2011).

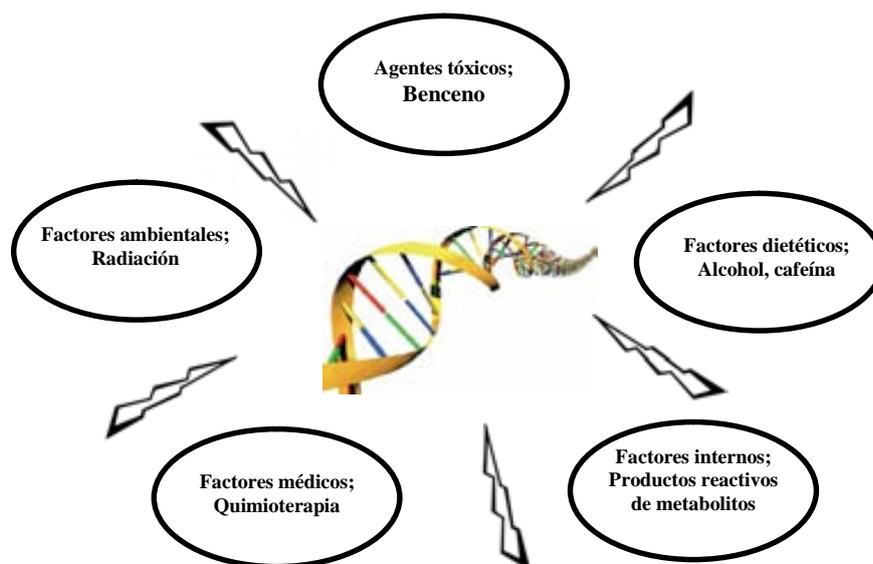


Figura 2. Factores externos o internos que afectan la integridad del genoma

Entre los factores externos encontramos factores ambientales (radiación ultravioleta o agentes tóxicos como el humo del tabaco), tratamientos médicos (radiografías, quimioterapia), factores dietéticos (ingesta de bebidas alcohólicas o cafeína) y alteraciones de señales que llegan a la propia célula (presencia o ausencia de moléculas extracelulares y de interacción entre células). Dentro de los factores internos destacan los errores en la replicación o reparación del DNA y la aparición de subproductos tóxicos del metabolismo celular, como el oxígeno reactivo.

La capacidad de reparar el daño en el DNA es crucial para la supervivencia de la célula y el mantenimiento de la estabilidad genómica, ya que puede producir patologías incluyendo el cáncer. De hecho, pacientes con deficiencia de algún mecanismo de reparación del DNA tienen un riesgo mucho más elevado de padecer cáncer, como es el caso de pacientes con el síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia ó xeroderma pigmentosum (Miller y Therman, 2001; Au *et al.*, 2010). Las células, para evitar el daño en el DNA, han desarrollado diversos mecanismos como la detención transitoria del ciclo celular, la activación de diferentes genes relacionados con reparación del DNA o la apoptosis, si el daño en el DNA es irreparable.

1.2.1. Puntos calientes susceptibles a roturas

En el genoma, las regiones conocidas como “puntos calientes” o *hotspots*, son más susceptibles a padecer roturas, dando lugar a inestabilidad genómica y variabilidad genética. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la exposición a sustancias genotóxicas producen roturas y reorganizaciones que se acumulan en estos lugares (Lukusa y Fyns, 2008). A nivel molecular, los *hotspots* se localizan preferentemente en regiones de cromatina con una estructura de configuración abierta DNasaI-hiperactivas. Sin embargo no todos los lugares sensibles a la DNasa I son *hotspots* evidenciando la complejidad de estos lugares.

Básicamente, existen dos tipos de *hotspots*: lugares frágiles cromosómicos (LF) y puntos calientes de recombinación meiótica. Los LF se conocen desde hace más de 40 años y se describen en el apartado siguiente. Los puntos calientes de recombinación meiótica, son lugares en los que se producen roturas de doble cadena que facilitan la recombinación durante la meiosis, fomentando la variabilidad genética de la especie (Khil y Camerini-Otero, 2010; Wahls *et al.*, 2011).

Lugares frágiles cromosómicos

Los LF se definen como regiones específicas del genoma (del orden de megabases) que se expresan como gaps o roturas en condiciones de estrés de replicación (Sutherland, 1979; HGM11, 1999). Se dividen en dos grupos basados en la frecuencia en la población, los LF raros (r-fra) que están presentes en menos del 5% de la población y los LF comunes (c-fra), que están presentes en todos los individuos (Sutherland y Richards, 1999). En el genoma humano se han descrito 118 LF, siendo 31 r-fra y 87-c-fra (HGM11, 1999). Los LF se clasifican según el agente inductor requerido para su expresión *in vitro*, los cuales provocan inhibición parcial de la replicación. La mayoría (77 %) de los r-fra se expresan en ausencia de ácido fólico mientras que la mayoría de los c-fra lo hacen en presencia de afidicolina (un inhibidor de la DNA polimerasa y). Recientemente, Mrasek *et al.* (2010) han propuesto 52 nuevos FS sugiriendo que, dado que todos los LF (c-fra y r-fra) pueden inducirse con afidicolina, sería más apropiado clasificarlos según su frecuencia de expresión y no por el modo de inducción como actualmente se definen. Las principales diferencias entre los c-fra y r-fra se muestran en la Figura 3.

Lugares frágiles raros r-fra	Lugares frágiles comunes c-fra
Presentes en < 5% de la población	Presentes en todos los individuos
Se inducen mayoritariamente en ausencia de ácido fólico	Se inducen mayoritariamente con afidicolina
Secuencias formadas por repeticiones di o tri nucleótidos, el más común (CGG) _n	Secuencias ricas en AT no repetitivas
Región del LF hipermetilada lo que puede provocar silenciamiento de genes	Formación de estructuras secundarias en la región del LF que retrasan o dificultan la replicación

Figura 3. Principales diferencias entre lugares frágiles cromosómicos raros y comunes.

Hasta ahora solo una pequeña parte de los LF se han caracterizado a nivel molecular (9 r-fra y 24 c-fra). Los r-fra presentan secuencias características formadas por repeticiones de di o trinucleótidos, siendo el más común el trinucleótido (CGG)_n. Los c-fra presentan secuencias ricas en AT no repetidas y, al igual que los r-fra, presentan replicación tardía. Esta última característica afecta la dinámica de replicación y disminuye la eficacia en el ensamblaje de nucleosomas, originando defectos de condensación cromosómica (Glover, 2006). Los programas informáticos FlexStab y Mfold (Mishmar *et al.*, 1998; Zucer, 2003) han permitido medir la variación del ángulo de giro entre los nucleótidos del DNA, identificando regiones de alta flexibilidad, normalmente llamados picos de flexibilidad (*flexibility peaks*). Recientemente, Arlt *et al.* (2006) han observado que los picos de flexibilidad tienen más tendencia a formar estructuras secundarias, retrasando o dificultando la replicación de DNA en estas regiones.

Los LF son secuencias altamente conservadas a lo largo de la evolución evidenciando que tienen una función importante, aún desconocida. Más de la mitad de los 186 genes que codifican para microRNA están localizados en bandas donde se ubican LF con una incidencia 9 veces mayor que en bandas sin LF (Calin *et al.*, 2004; Lagana *et al.*, 2010). Los microRNAs desempeñan un papel importante en la célula como reguladores de genes supresores de tumores y de genes que regulan la apoptosis y proliferación celular. Los LF y los genes que codifican para microRNAs tienen en común el ser lugares de integración vírica, como por ejemplo el HPV (*Human papilloma virus*) (Durkin y Glover, 2007; Lukusa y Frys, 2008; Dillon *et al.*, 2010; Debatisse *et al.*, 2012).

Helmrich *et al.* (2006) han observado la existencia de una correlación entre el nivel de transcripción de un gen y el nivel de inestabilidad del lugar correspondiente. Estos mismos autores han sugerido que la transcripción de genes grandes interfiere con la replicación del DNA porque se forman híbridos entre el DNA y RNA (*R-loops*), aumentando la inestabilidad en regiones con LF (Helmrich *et al.*, 2011). La presencia de inestabilidad genómica con frecuencia se asocia a trastornos patológicos, envejecimiento prematuro y a la predisposición a diversos tipos de cáncer.

Los LF, al ser regiones altamente inestables, predisponen a la aparición de alteraciones cromosómicas estructurales, y en el caso de que sean desequilibradas podrían transformar la célula en cancerosa si queda afectada la función de un oncogén ó un gen supresor de tumor (Sutherland y Richards, 1999; Pollack, 2006).

1.3. Lesiones y alteraciones cromosómicas estructurales

Las roturas cromosómicas son relativamente frecuentes en la especie humana, concentrándose en determinadas regiones cromosómicas o *hotspots*. La mayoría de estas roturas son reparadas correctamente, pero algunas originan una amplia variedad de lesiones y alteraciones cromosómicas.

Las roturas cromosómicas pueden producirse en cualquier fase del ciclo celular. Si la rotura se origina durante la fase pre-S ó G1 del ciclo celular, y no se repara en la fase S, se observa en ambas cromátides, dando lugar en la siguiente metafase a una rotura de cromosoma (chsb). Si el fragmento roto no se desplaza respecto a la cromátide original se produce un gap de cromosoma (región no teñida menor que el ancho de la cromátide) (chsg). En cambio, si la rotura ocurre en el periodo post-S o G2, se hace visible en una única cromátide dando lugar a una rotura de cromátide (chtb) o un gap de cromátide (chtg), dependiendo si hay desplazamiento o no. Estos cuatro tipos de roturas no reparadas se denominan lesiones cromosómicas (Fig.4) y se observan fácilmente en los cromosomas mediante tinción uniforme.

Lesión	Tipo cromátide	Tipo cromosoma
Gap	Rotura durante la fase post_S o G2	Rotura durante la fase pre-S o G1
	Fragmento alineado Nomenclatura: chtg	Fragmentos alineados Nomenclatura: chsg
Rotura	Rotura durante la fase post-S o G2	Rotura durante la fase pre-S o G1
	Fragmento no alineado Nomenclatura: chtb	Fragmento no alineado Nomenclatura: chsb

Figura 4. Tipos y principales características de las lesiones cromosómicas

Las roturas cromosómicas que dan lugar a la pérdida o a la reorganización de fragmentos cromosómicos producen alteraciones cromosómicas. Cuando las roturas no son reparadas se producen fragmentos acéntricos que terminan perdiéndose en las sucesivas divisiones dado que carecen de centrómero. Si las roturas se reparan erróneamente, los fragmentos cromosómicos liberados por las roturas pueden intercambiarse con otros fragmentos, insertarse en otro cromosoma o invertir su orientación, dependiendo del número y lugar cromosómico de las roturas. En la Figura 5 se resumen los principales tipos de alteraciones cromosómicas estructurales intracromosómicas (roturas en un único cromosoma) e intercromosómicas (roturas en dos o más cromosomas).

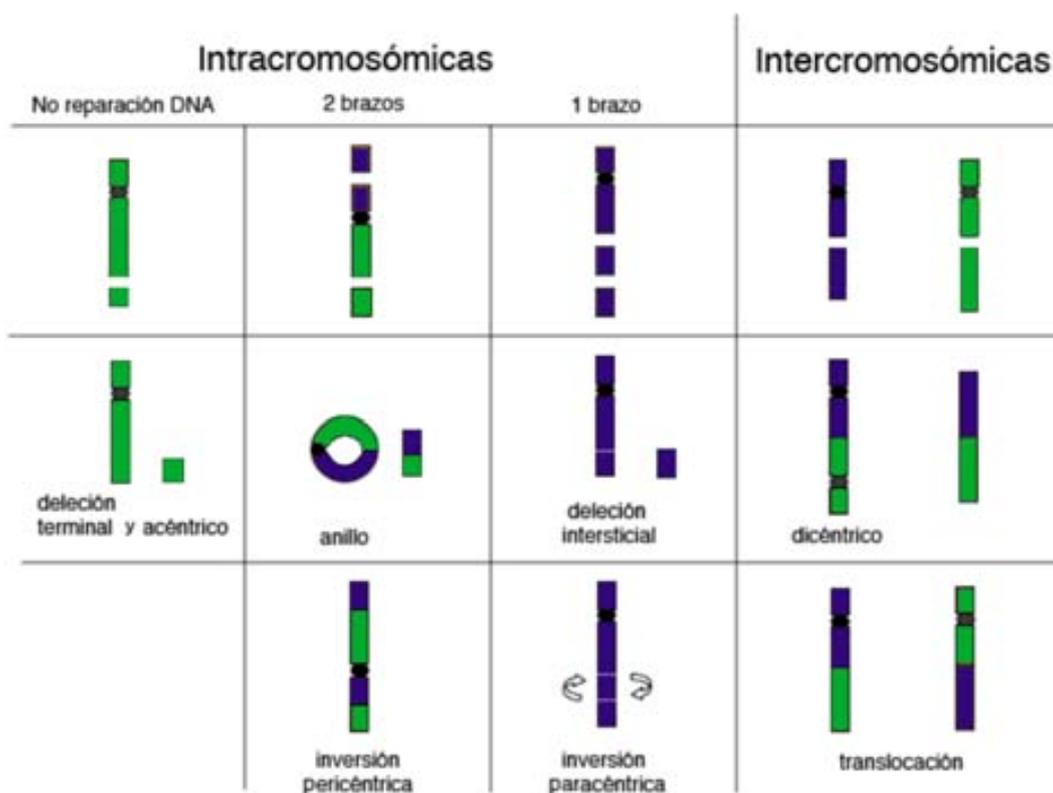


Figura 5. Principales tipos de alteraciones cromosómicas estructurales

Los mecanismos moleculares implicados en la formación de alteraciones cromosómicas estructurales son la recombinación homóloga no alélica (NAHR, *non allelic homologous recombination*,) y la fusión de extremos no homólogos (NHEJ, *non homologous end joining*). Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo, denominado FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*) que permite explicar reorganizaciones complejas (Gu *et al.*, 2008; Hasting *et al.*, 2009)

El mecanismo NAHR se produce cuando hay un intercambio de secuencias no alélicas que comparten un elevado grado de homología, 95-97% (como por ejemplo las DS antes mencionadas). Varios estudios han demostrado que las regiones flanqueadas por DS son puntos especialmente sensibles a la actuación del mecanismo de NAHR, lo que indica que la presencia de DS predispone a la aparición de reorganizaciones cromosómicas, duplicaciones y deleciones. Si las dos secuencias homólogas son adyacentes y tienen la misma orientación dan lugar a duplicación y deleción. Si, por el contrario, las secuencias homólogas están

situadas en cromosomas no homólogos, la recombinación no alélica resulta en una translocación (Fig. 6). El mecanismo NHEJ es básicamente de reparación de roturas de doble cadena en zonas sin homología

1.4. Alteraciones cromosómicas como biomarcador de genotoxicidad

El término “biomarcador o indicadores biológicos” incluye, en sentido amplio, cualquier parámetro que se pueda medir y que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente tóxico. Los biomarcadores pueden medirse a nivel molecular, bioquímico o celular (tanto en poblaciones de hábitats contaminados como en organismos expuestos a sustancias tóxicas) y permiten evaluar la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante (McCarthy y Shugart, 1990). Los biomarcadores, además de servir para estudiar relaciones causa-efecto, contribuyen a conocer el metabolismo en el que actúan los agentes contaminantes. Los biomarcadores (biomarcadores de exposición) indican el daño producido por la exposición (biomarcadores de primeros efectos biológicos y biomarcadores de riesgo para la salud) (Fig. 7).

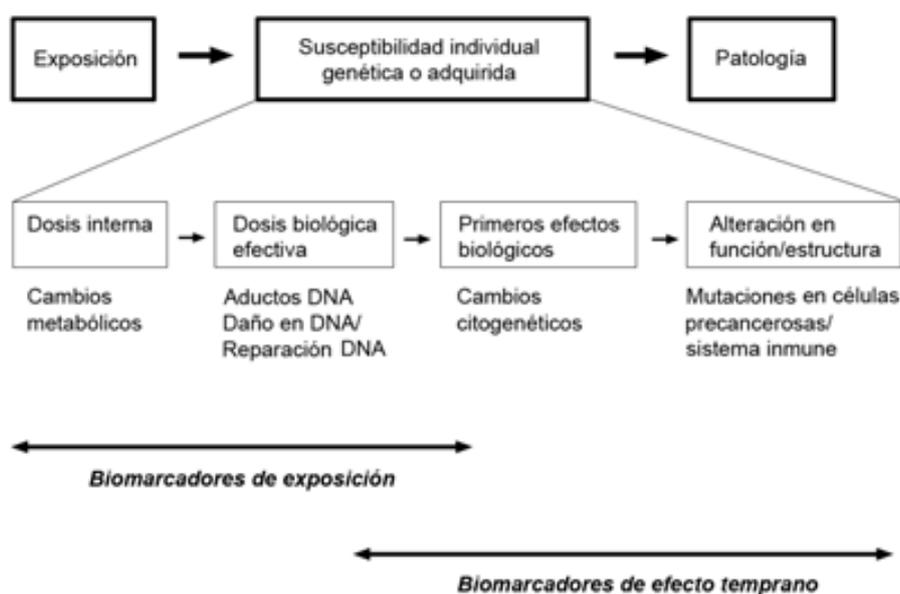


Figura 7. Esquema de los diferentes tipos de biomarcadores.

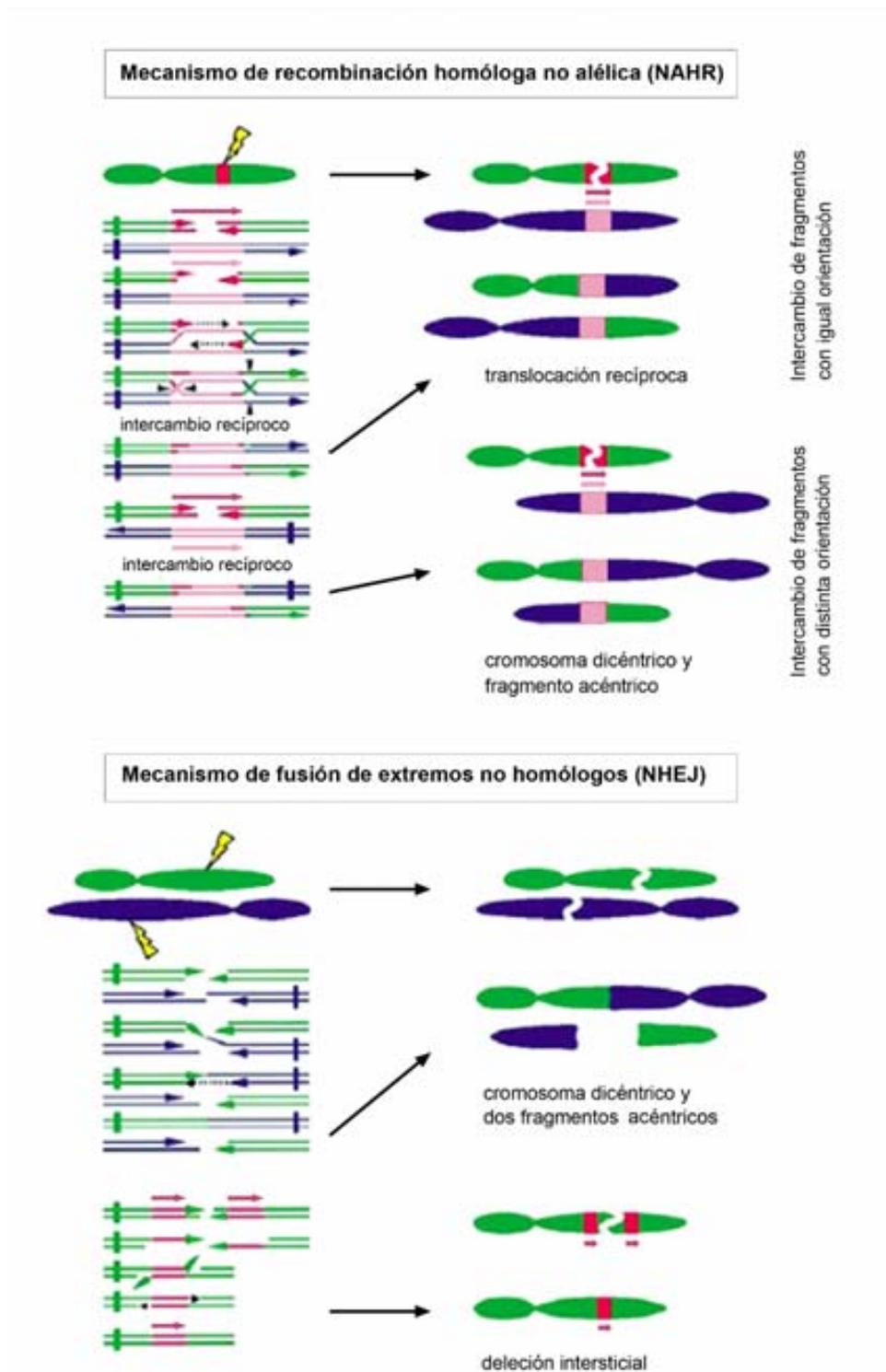


Figura 6. Origen de algunos tipos alteraciones cromosómicas estructurales mediante el mecanismo de recombinación homóloga no alélica (NAHR) y de fusión de extremos no homólogos (NHEJ) (Imagen modificada de Mateuca *et al.*, 2006).

Se ha definido un nuevo biomarcador, conocido como biomarcador de susceptibilidad, que muestran la capacidad/defecto, heredado o adquirido, de un organismo para enfrentarse a la exposición a sustancias tóxicas. Un ejemplo de este tipo de biomarcadores son polimorfismos en genes responsables del metabolismo de sustancias tóxicas, como los genes de la superfamilia de glutathion S-transferasa (GSTs) y los genes involucrados en la reparación de DNA (Suspiro y Prista, 2011).

Entre los biomarcadores de exposición encontramos, entre otros, la identificación y cuantificación de metabolitos específicos en fluidos corporales, derivados de los agentes químicos de la exposición. Los mutágenos de exposición pueden actuar de manera directa o indirecta en el DNA. Pueden unirse a proteínas responsables de la integridad genómica como, por ejemplo, enzimas de reparación y proteínas responsables de controlar el ciclo celular, provocar cambios de metilación del DNA o modificación de histonas. La modificación de histonas (acetilación y desacetilación) tiene un papel importante en la integridad genómica al descondensar la cromatina facilitando que se puedan producir roturas en el DNA (Jiang *et al.*, 2009)

Los biomarcadores de genotoxicidad miden el daño producido por la exposición y permiten evaluar el daño originado en el material hereditario. En citogenética, los biomarcadores más estudiados son los intercambios de cromátides hermanas (SCE), los micronúcleos (MN) y las alteraciones cromosómicas. Los SCE son intercambios de fragmentos iguales de material genético entre dos cromátides hermanas. Las células expuestas a agentes genotóxicos muestran un incremento notable de estos intercambios. Sin embargo, no se ha podido establecer una asociación directa entre un aumento de estos intercambios y un mayor riesgo de padecer cáncer (Norpa *et al.*, 2006; Garcia-Sagredo, 2008). Los MN se forman cuando las roturas cromosómicas no reparadas originan grandes fragmentos que quedan excluidos del núcleo durante la división celular. Dada la similitud de los mecanismos de formación de MN y de alteraciones cromosómicas, cabe esperar que un aumento de MN aumente el riesgo a padecer cáncer, aunque de momento esa asociación no es tan evidente como en el caso de las alteraciones cromosómicas (Hagmar *et al.*, 1998).

Las alteraciones cromosómicas son un buen biomarcador de primeros efectos biológicos debido a que se ha demostrado que casi todas las sustancias ambientales tóxicas inducen un aumento de este tipo de alteraciones. Constituyen también un biomarcador de riesgo para la salud, debido a que existe una asociación entre un aumento del riesgo a padecer cáncer con un mayor número alteraciones cromosómicas (Au *et al.*, 2006 y 2010). Desde hace más de 30 años es conocida la relación entre exposición a agentes cancerígenos y aparición de

alteraciones cromosómicas (Schinzel y Schmid, 1976). Sin embargo, se necesitaron veinte años más para confirmar que el aumento de alteraciones cromosómicas en linfocitos se asociaba a un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Brogger *et al.*, 1990; Hagmar *et al.*, 1994; Bonassi *et al.*, 1995; Hagmar *et al.*, 1998). Actualmente son muchos los estudios que confirman esta asociación por lo que se considera que las alteraciones cromosómicas son el mejor biomarcador para estimar el riesgo al cáncer. Aunque las alteraciones cromosómicas son biomarcador excelente, presenta el inconveniente, respecto a otros biomarcadores, de requerir mucho trabajo de personal altamente especializado. Por esta razón, generalmente se utilizan otros biomarcadores en estudios de genotoxicidad (Liou *et al.*, 1999; Smerhovsky *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Hagmar *et al.*, 2004; Rossner *et al.*, 2005; Au, 2006; Mateuca *et al.*, 2006; Norpa *et al.*, 2006; Boffetta *et al.*, 2006; Bonassi *et al.*, 2008).

Al utilizar las alteraciones cromosómicas como biomarcador se detectan grandes variaciones de expresión entre individuos expuestos a un mismo mutágeno en condiciones similares evidenciando que unos individuos son susceptibles a la exposición mientras otros son resistentes. Los factores que contribuyen a estas diferencias son muy variados y pueden ser adquiridos o genéticos. Los factores adquiridos son los que van actuando a lo largo de la vida del individuo (por ejemplo, hábitos de nutrición, tabaco, infecciones y edad), mientras que los genéticos se heredan y consisten fundamentalmente en variaciones genéticas que afectan al metabolismo químico y reparación del DNA. Hoy en día se conocen genes con polimorfismos implicados en el desarrollo de cáncer, evidenciando la existencia de susceptibilidades diferentes a padecer cáncer entre individuos (Au, 2006). Así los individuos heterocigotos para el gen *BRCA1* tienen un riesgo del 80% a desarrollar cáncer durante su vida y los pacientes con xeroderma pigmentosum con la mutación en el gen *XP* desarrollan cáncer de piel en más del 90% de los casos. Se ha intentado establecer una asociación entre estos genes polimórficos (principalmente los implicados en el metabolismo de agentes tóxicos) y el aumento de alteraciones cromosómicas o desarrollo de cáncer. De momento, no se ha llegado a ninguna conclusión, porque existen discrepancias entre los diferentes estudios. (Saarikoski *et al.*, 1998; Pavanello y Confero, 2000; Au y Salama, 2005; Matullo *et al.*, 2006; Perez-Cadahía *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2009).

1.5. Agentes químicos genotóxicos

Los agentes tóxicos son elementos o compuestos químicos que, absorbidos por el organismo, son capaces de producir daño en la salud, incluso a bajas dosis, temporal, permanente e

incluso mortal. Los agentes genotóxicos son agentes tóxicos capaces de producir algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados. Bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan, tanto directa como indirectamente, con el DNA provocando mutaciones, interfiriendo en procesos enzimáticos de reparación del DNA y en la síntesis de proteínas involucradas en la segregación cromosómica. Algunos de estos agentes son carcinógenos porque al actuar en los tejidos producen cáncer mientras que los agentes cancerígenos “pueden” causar o predisponer al cáncer.

La agencia de protección ambiental (*Environmental Protection Agency, EPA*) considera que , las cinco sustancias más tóxicas para la salud humana y el medio ambiente son: arsénico, plomo, mercurio, cloruro de vinilo y bifenilos policlorados.

Dentro de los agentes tóxicos, se encuentra la exposición crónica o accidental al fuel. El fuel es una mezcla compleja de compuestos orgánicos, de los cuales, los más peligrosos para la salud son: compuestos orgánicos volátiles (COV), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y metales pesados.

Compuestos orgánicos volátiles: benceno

Algunos COV se pueden clasificar según la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) por su toxicidad dentro del Grupo 1, es decir, son carcinógenos en humanos, como es el caso del benceno.

El benceno y sus metabolitos son genotóxicos y frecuentemente causan daño cromosómico dando lugar a roturas de DNA y SCE en linfocitos y en células de la medula ósea (Aksoy, 1989; Holeckova *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2010; Smith, 2010). El 98% del benceno producido proviene de la industria de fuel y refinerías, por lo que los lugares donde los humanos se exponen más al benceno son fábricas, refinerías y entorno industrial (Zhang *et al.*, 2002). También existen fuentes naturales de benceno, como emisiones de volcanes, incendios de bosques. El humo del tabaco se considera, hoy día, como la fuente principal de exposición al benceno en personas fumadoras.

Una exposición a altos niveles de benceno puede tener consecuencias graves, incluyendo la muerte. Existe una asociación entre exposición al benceno y el desarrollo a neoplasias hematológicas, existiendo, sin embargo, una susceptibilidad individual (Barregard *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Marchetti *et al.*, 2012).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Según la IARC, los HAPs están clasificados dentro del Grupo 2, como posible o probables carcinógenos en humanos. Estos componentes son contaminantes comunes en las grandes ciudades, en ambientes industriales y en el humo de tabaco. Se han caracterizado centenares de HAPs pero el más conocido es el benzo(a)pireno (BP), que es especialmente importante en los estudios genotóxicos por su poder mutagénico y por generar roturas de DNA a través de radicales libres. En general, los BP tienen una gran afinidad para unirse al centro nucleofílico de macromoléculas como RNA y DNA formando enlaces covalentes y aductos de DNA, un paso importante en la carcinogénesis (Boffetta *et al.*, 1997). Se han descrito efectos genotóxicos del BP asociado principalmente a un incremento de MN y alteraciones cromosómicas (Pavanello *et al.*, 2008; Orjuela *et al.*, 2010).

Metales pesados

Los metales pesados tienen tendencia a acumularse en ciertos tejidos del cuerpo humano y pueden ser muy tóxicos, incluso a exposiciones muy bajas (Waalkers *et al.*, 2003). Según la IARC, el aluminio, cadmio y níquel están clasificados en el Grupo 1 como carcinógenos humanos, mientras que el plomo está catalogado dentro del Grupo 2 como posible carcinógeno. Los metales pesados más abundantes en el suelo son el cadmio y el plomo.

El cadmio afecta a las células del organismo de múltiples formas: alterando la progresión del ciclo celular, la proliferación y diferenciación celular, así como la apoptosis. También interviene inhibiendo la síntesis y la reparación de DNA, aumenta el estrés oxidativo causando daño en el DNA y produciendo silenciamiento de genes (alteraciones epigenéticas). Se ha descrito que produce un incremento de SCE y alteraciones cromosómicas (Abrahim *et al.*, 2011). Dado los múltiples caminos donde pueda actuar es muy difícil conocer el papel que desempeña en la carcinogénesis.

El plomo actúa indirectamente sobre el DNA, afectando la estabilidad de la cromatina o interactuando con los mecanismos de reparación de DNA. Sin embargo, no está claro su implicación en la aparición de alteraciones cromosómicas (García-Lestón *et al.*, 2012).

El Zinc es un metal pesado que tiene efectos positivos al inhibir la acción del cadmio y plomo (Khlifi, 2010). Estudios recientes han revelado que los metales pesados, como mercurio y seleno, pueden alterar el funcionamiento de determinados genes, a través de mecanismos epigenéticos, como la metilación de DNA y modificación de histonas (Arai *et al.*, 2011).

1.6. La catástrofe del petrolero *Prestige*

En noviembre de 2002, el petrolero *Prestige* se encontraba navegando a unos 50 km de la costa Fisterra (Galicia), en medio de un temporal, cuando sufrió un problema estructural grave que provocó el vertido de grandes cantidades del fuel. Las autoridades portuarias, viendo el grave riesgo de contaminación, intentaron alejar el barco de la costa pero, tras varios días de maniobras, el petrolero se partió en dos y acabó hundido a unos 250 km de la costa gallega. La Figura 8 muestra el desplazamiento del petrolero desde que se produjo la avería hasta el hundimiento.



Figura 8. Imagen de satélite que muestra la mancha del fuel y el desplazamiento del petrolero *Prestige* averiado (arriba). El buque justo antes de su hundimiento (abajo).

El buque transportaba 77.000 toneladas de fuel y durante el trayecto que realizó averiado vertió al mar más de 20.000 toneladas. Después del naufragio continuó saliendo fuel originando un vertido adicional de 40.000 toneladas. Gran parte de este fuel llegó, durante las siguientes semanas, a las costas de Galicia, Asturias, Cantabria y País Vasco, provocando la mayor catástrofe ecológica de España (Albaiges *et al.*, 2006; http://mareostrum.org/ecologia/medio_ambiente/prestige/). En total, se calcula que llegó a las costas unas 63.000 toneladas de fuel, afectando a más de 1000 km de costa gallega.

El petrolero Prestige transportaba fuel pesado caracterizado por tener una elevada densidad, alta viscosidad, alto contenido de azufre (4%) y por su poca tendencia a evaporarse y dispersarse formando emulsiones estables en el agua. Los análisis de los componentes del fuel (Bosch, 2003; Rodríguez-Trigo *et al.*, 2007) mostraron la presencia en un 50% hidrocarburos aromáticos, 22% hidrocarburos saturados, 28% resinas y asfaltanos y altos contenidos de metales pesados (cadmio, plomo y níquel).

La contaminación de fuel fue amplia pero heterogénea debido a las características geográficas de la costa, las condiciones climáticas y los corrientes marinas, afectando mucho a unas zonas, como Fisterra y Muxía, y poco a otras, como Noia y Vilagarcía de Arousa.

Poco después del accidente se empezaron a organizar las tareas de limpieza del fuel. Desde el primer momento, los pescadores y sus familias participaron activamente en las tareas, pero sin equipos de protección adecuados (Fig.9).

Progresivamente, se fueron incorporando voluntarios de todas las regiones y de muchos países y, finalmente profesionales y militares. Realmente, fue un gran movimiento solidario ya que se calcula que participaron más de 300.000 personas en las labores de limpieza.

1.7. Efecto en la salud de la exposición al fuel vertido

Los efectos adversos de los vertidos del fuel sobre la flora y fauna han sido extensamente estudiados. Sin embargo los estudios sobre los efectos en la salud son escasos y la mayoría se centran en la aparición de efectos agudos y síntomas fisiológicos.

Desde 1967 se dispone de una base de datos que contiene información sobre estos vertidos (cantidad y tipo de fuel), causa del accidente y la ubicación del petrolero implicado (<http://www.itopf.com>). De todos ellos, destacan ocho accidentes de petroleros, ocurridos entre 1989 y 2007, por sus grandes vertidos de fuel.



Figura 9. Pescadores limpiando fuel sin ningún tipo de protección

También podríamos incluir en este tipo de accidentes los ocurridos en plataformas petroleras como la del Golfo de Méjico por producir exposiciones agudas de grandes cantidades de fuel (Goldstein *et al.*, 2011) (Tabla 1).

De todos estos vertidos, se dispone información detallada sobre los síntomas físicos producidos, como irritación de ojos, cefaleas, irritación garganta, dificultades respiratorias, nauseas y vómitos y trastornos como ansiedad y depresión (revisado por Monyarch, 2010). En el caso del Prestige destacan los trabajos publicados sobre las consecuencias para la salud de la exposición al fuel de Suarez *et al.* (2005), Albaiges, (2006), Carrasco *et al.* (2006 y 2007); Rodríguez-Trigo *et al.* (2007); Zock *et al.* (2007); Sabudeco *et al.* (2009).

Tabla 1. Grandes vertidos de fuel ordenados por años

Vertidos	Año	País	Cantidad de fuel (t)
Petrolero			
Exxon Valdez	1989	Alaska (EE.UU)	37000
MV Braer	1993	Reino Unido	85000
Sea Empress	1996	Reino Unido	72000
Nakhodka	1997	Japón	>6000
Erica	1999	Francia	20000
Prestige	2002	España	63000
Tasman Spirit	2003	Pakistan	37000
Hebei Spirit	2007	Corea	10500
Plataforma			
Deepwater Horizon	2010	Golfo de Mejico (EE.UU)	779000

Es interesante destacar que en el caso por el accidente de la plataforma petrolera del golfo de Méjico, Deepwater Horizon, el Instituto Nacional de Ciencias Ambientales y de la Salud de USA están realizando un estudio en 55000 individuos y contemplan realizar un estudio de seguimiento a los 5 años (Schmidt, 2011; <http://nihgulfstudy.org>).

A diferencia de los estudios relacionados con la salud, son muy escasos los estudios genotóxicos en este tipo de exposiciones. Antes del accidente del Prestige, sólo se habían publicado dos trabajos dirigidos a estudiar los efectos genotóxicos de la exposición al fuel, analizando SCEs y alteraciones cromosómicas (Clare *et al.*, 1984) y aductos de DNA (Cole *et al.*, 1997). Sólo en el trabajo de Clare *et al.* (1984) se describe daño genotóxico en los individuos expuestos al fuel.

El elevado número de estudios genotóxicos realizados como consecuencia de la catástrofe del Prestige se explica por su gran interés científico y social (altos contenidos de sustancias tóxicas en del fuel y gran cantidad de voluntarios que participaron en las labores de limpieza muchos de ellos sin medidas de protección). Las consecuencias genotóxicas de la exposición al fuel vertido por el Prestige fueron realizados por dos grupos españoles: uno de la Universidad de A Coruña y el otro en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los estudios genotóxicos realizados por el grupo de A Coruña determinaron la concentración de componentes orgánicos volátiles en el ambiente y la concentración de metales pesados en sangre de los individuos durante las labores de limpieza, analizaron diferentes biomarcadores (SCE, micronúcleos, ensayo cometa). Además determinaron la toxicidad a nivel endocrino midiendo las concentraciones en plasma de prolactina y de cortisol y estudiaron los

polimorfismos de los genes implicados en el metabolismo enzimas (CYP1A1, CYP1B1, EPHX1) y en la reparación de DNA (Laffon *et al.*, 2006; Perez-Cadahia *et al.*, 2006; Perez-Cadahia *et al.*, 2007; Perez-Cadahia *et al.*, 2008a; Perez-Cadahia *et al.*, 2008b; Perez-Cadahia *et al.*, 2008c). Aunque se analizan diferentes biomarcadores, todos estos estudios concluyen que el grado de exposición durante los trabajos de limpieza está asociado con un aumento de daño cromosómico. Hasta el momento, después del Prestige, no se han publicado estudios de genotoxicidad en ninguno de los grandes accidentes ocurridos (Tasman Spirit, Hebei Spirit y Deepwater Horizon) a pesar de la gran cantidad de personas expuestas al fuel y de la cercanía a las costas. Se ha publicado, diferentes revisiones de los efectos sobre la salud de la exposición al fuel (Ha *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2010; Monyarch, 2010; Goldstein *et al.*, 2011; Zock *et al.*, 2011).

1.8. El proyecto SEPAR-Prestige

En enero de 2003, la junta directiva de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) impulsó el “Estudio Epidemiológico de las repercusiones clínicas, biológicas y funcionales del vertido de fuel del buque Prestige en marineros de la costa de Galicia” (proyecto SEPAR-Prestige) destinado a evaluar el impacto de la exposición sobre la salud respiratoria. Posteriormente este proyecto contó con la ayuda económica del Centro Respira de Investigación (CRI), de la red Respira (RTIC, 03/11) y del fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI03/1685 y PI07-0086). En menos de un mes se fueron incorporando nuevos investigadores constituyendo un equipo multicéntrico y multidisciplinar compuesto por neumólogos, epidemiólogos, toxicólogos y expertos en genética.

1.8.1. Estudio Inicial: Prestige I

El estudio, actualmente conocido como Prestige I, fue diseñado para abordar tres aspectos:

- 1) Conocer los efectos respiratorios a nivel clínico-funcional
- 2) Determinar la presencia de marcadores biológicos de inflamación de las vías respiratorias y de estrés oxidativo
- 3) Estudiar la genotoxicidad en sangre periférica (realizado en nuestro laboratorio)

En primer lugar, se elaboró un cuestionario de salud diseñado para este estudio y se encuestaron más de 10.000 pescadores, obteniendo respuesta de 6780. La elaboración de los datos de las encuestas permitió concluir que, un año después de la exposición, persistía un aumento de síntomas respiratorios en personas que habían trabajado más días, más horas al

día, y realizado más tareas de limpieza (Zock *et al.*, 2007). A partir de los datos obtenidos en las encuestas se definió la población (cofradías de pescadores) y los criterios de selección del grupo de individuos expuestos al fuel (E) y no expuestos (NE). Los criterios fueron muy restrictivos y permitieron clasificar dos grupos muy extremos los muy, muy expuestos y los poco, poco expuestos (Zock *et al.*, 2007).

Para la realización de las pruebas respiratorias funcionales y obtención de muestras biológicas se utilizó una Unidad Móvil, dotada de consulta médica y laboratorio, que se desplazaba por las diferentes cofradías gallegas. En total participaron en esta etapa del estudio 501E y 177NE durante el periodo que va de julio de 2004 a febrero de 2005, es decir había transcurrido entre un año a año y medio después de la exposición al fuel. La compleja estrategia utilizada así como los principales resultados han sido descritos por Rodríguez-Trigo *et al.* (2010) y Monyarch (Tesis doctoral, 2010).

El estudio de genotoxicidad se realizó en la Unidad de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la UAB utilizando como biomarcadores MN y lesiones y alteraciones cromosómicas. El test de MN no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Gloria Biern, máster 2010). Sin embargo, el análisis de alteraciones cromosómicas realizado en 91E y 46NE reveló una clara asociación entre grado de exposición al fuel y daño cromosómico, observándose que en individuos E predominaban las alteraciones estructurales desequilibradas. El análisis del daño cromosómico a partir de cultivos expuestos a afidicolina (un inhibidor de la DNA polimerasas) reveló que el incremento de lesiones y alteraciones cromosómicas se debía a errores en los mecanismos de reparación del DNA (Monyarch *et al.*, 2012). El estudio más detallado de la distribución de roturas implicadas en el daño cromosómico evidenció que las tres bandas más afectadas, 2q21, 3q27 y 5q31, estaban frecuentemente implicadas con cáncer hematológicos, confirmando la necesidad de realizar un estudio de seguimiento (Monyarch, 2010; Monyarch *et al.*, 2012).

1.8.2. Estudio de seguimiento: Prestige II

Dada la alta trascendencia clínica y social de los resultados obtenidos en el estudio previo (Prestige I), tanto para los individuos que participaron en las tareas de limpieza como para otras personas que en el futuro intervendrán en tareas similares, se planteó la necesidad de realizar un estudio de seguimiento para determinar si estos efectos, o alguno de ellos, podrían haber disminuido o incluso desaparecido transcurrido más tiempo.

Este nuevo estudio ha sido financiado por SEPAR y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI07-0086) y además ha contado con la ayuda económica del Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias y de Neoplasia torácica (CIBERES), CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica y Servicio de Salud Gallego (SERGAS). Hasta el momento, no existe ningún estudio epidemiológico con estas características.

Por el momento, la información obtenida mediante encuestas realizadas a 622 marineros, entre Junio-Julio del 2008, ha revelado que, aunque los síntomas de las vías respiratorias han disminuido ligeramente, se sigue observando una asociación entre la intensidad de la exposición y la presencia de síntomas. La menor intensidad de la asociación detectada no se debe a que los individuos E hayan mejorado, sino a que los individuos NE con problemas respiratorios están aparentemente sobre-representados. La interpretación de estos datos es muy compleja, tanto por las implicaciones sanitarias como por los posibles sesgos que puedan haber (Zock *et al.*, 2012).

Las pruebas de función pulmonar y la obtención de muestras de condensado de aire exhalado y de sangre periférica (suero y plasma) para llevar a cabo los estudios de IgE y de genotoxicidad se han realizado, en la Unidad Móvil, de noviembre de 2008 a abril de 2009 (de 6 años a 6 años y medio después del vertido del fuel). Actualmente los análisis de función respiratoria ya se han finalizado y se el análisis de marcadores biológicos de inflamación de las vías respiratorias y de estrés oxidativo está apunto de terminar. En la Tabla 2 se muestran las diferentes pruebas y análisis realizadas en los dos estudios, Prestige I y Prestige II.

Una gran parte del análisis genotóxico realizado forma parte de esta Memoria.

Tabla 2. Proyecto SEPAR-Prestige

	Prestige I (2004-2005)	Prestige II (2008-2009)
1. Función pulmonar	Si	Si
2. Inflamación respiratoria y estrés oxidativo	Si	Si
3. Genotoxicidad:	Si	Si
a) Alteraciones cro. en cultivo de 48h	No	Si
b) Alteraciones cro. en cultivo de 72h	Si	Si
c) Test de MN	Si	Si
d) A.cromosómicas. inducidas con apc	Si	Si

2. Objetivos

2. Objetivos

En un estudio genotóxico previo realizado en nuestro grupo (Prestige I) los individuos expuestos al fuel presentaban, dos años después de la exposición, más alteraciones cromosómicas estructurales que los no expuestos, (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, tesis doctoral 2010). Estos resultados eran preocupantes, dada la asociación entre el incremento de alteraciones cromosómicas y riesgo a desarrollar cáncer por lo que el objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar si el efecto genotóxico detectado persiste transcurridos 4 años del estudio anterior (Prestige I).

Este objetivo general comprende los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar a partir del cultivo de linfocitos de individuos expuestos y no expuestos al fuel las:
 - Lesiones cromosómicas (gaps y roturas) con tinción uniforme
 - Anomalías cromosómicas (estructurales y numéricas) con bandas G
2. Comparar el daño cromosómico detectado en el grupo de expuestos y no expuestos para valorar el efecto de la exposición al fuel.
3. Determinar si las roturas cromosómicas detectadas se localizan en bandas cromosómicas especialmente sensibles al fuel.
4. Comparar los resultados citogenéticos obtenidos en este estudio de seguimiento con los observados en el estudio anterior (Prestige I) para determinar el efecto genotóxico, seis años después de la exposición al fuel.

3. Material y métodos

3.1 Individuos incluidos en el estudio

El presente trabajo, Prestige II, constituye un estudio genotóxico de seguimiento realizado seis años después de la exposición al fuel versus a los dos años transcurridos en el primer estudio Prestige I.

Los criterios de selección de los individuos expuestos al fuel (E) y no expuestos (NE) han sido los mismos que los del Prestige I (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010). Brevemente, estos criterios de inclusión a cada grupo consisten en:

Grupo E: Ser pescador/mariscador de una de las 15 cofradías más afectadas por el fuel de la costa atlántica, haber participado un mínimo de 15 días en las actividades de limpieza durante 4 horas o más al día y haber trabajado en el periodo de máxima contaminación, es decir, desde noviembre a diciembre de 2002.

Grupo NE: Ser pescador/mariscador de una de las 16 cofradías menos afectadas de la costa cantábrica, no haber participado en las tareas de limpieza por motivos no relacionados con problemas de salud.

Criterios adicionales. Para el estudio de genotoxicidad (Prestige I y II) todos los individuos E y NE seleccionados debían cumplir además los siguientes requisitos: Ser no fumador, fértil (tener por lo menos un hijo), no haber estado expuesto a agentes tóxicos y no padecer o haber padecido cáncer.

Durante el desarrollo del proyecto de genotoxicidad del Prestige II en nuestro laboratorio de la UAB se recibieron muestras de sangre procedentes de 124 pescadores y mariscadores gallegos que habían participado en las labores de limpieza del Prestige. Posteriormente, se descartaron 19 muestras por no cumplir alguno de los criterios de selección, mala calidad de la muestra o pobre crecimiento celular de los linfocitos. Nueve individuos que presentaban tumores no fueron incluidos en el estudio de seguimiento y han sido analizados como un grupo aparte. En total nuestro estudio citogenético se ha realizado en 105 individuos.

Todos los individuos firmaron el consentimiento para participar en el estudio de genotoxicidad. Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas de Galicia.

3.2. Tipo y transporte de muestras

El tipo de muestra utilizada en este estudio ha sido sangre periférica. A cada individuo se le extraía de 3 a 5 ml de sangre, recogida en un tubo estéril con heparina sódica 0.1% (Rovi) como anticoagulante. La extracción de sangre se realizó en una Unidad Móvil,

convenientemente equipada, que viajaba por las costas gallegas. Las muestras obtenidas se llevaban al Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (antiguo Hospital Juan Canalejo) donde se guardaban hasta enviarse a la UAB (más de 1000 km de distancia). La Unidad Móvil recogía muestras 4 días por semana y eran enviadas a nuestro laboratorio dos veces por semana.

Para conservar la viabilidad de los linfocitos y asegurar su crecimiento en cultivo fue necesario realizar el transporte de muestras a 4°C. Además, el tiempo transcurrido entre la extracción y el cultivo de linfocitos no podía exceder las 48 horas (Fig.10). Con el fin de detectar posibles alteraciones en la cadena del frío, las muestras se guardaron en un recipiente especial, llamado Biotainer E Còrtex, provisto de un termómetro digital. En algunos envíos la temperatura bajó a cero grados y en todos estos casos no se obtuvo crecimiento en el cultivo de linfocitos.



Figura 10. Logística y diseño empleado en el estudio

Cada muestra contenía un número de identificación de 6 dígitos que se asignaba en la Unidad Móvil. En el laboratorio de la UAB se daba un nuevo número de identificación de sólo 2 dígitos para facilitar el etiquetado. Por tanto, el personal del laboratorio desconocía la procedencia de la muestra, si procedía de un individuo E o NE, con el fin de llevar a cabo el análisis citogenético de los casos “a ciegas”.

La recogida, traslado y procesado de las muestras fue realizada de noviembre de 2008 a abril de 2009 (de 6 años a 6 años y medio después del vertido del fuel).

3.3. Procesado de muestras: Cultivo de linfocitos

Los cultivos celulares se han realizado en la UAB dentro de las 48 horas posteriores a la extracción de sangre periférica.

En el estudio global Prestige II se han analizado diferentes biomarcadores de genotoxicidad en linfocitos cultivados en cuatro condiciones distintas que diferían en el tiempo de cultivo o en la adición de agentes químicos al cultivo (Fig.11).

- Cultivos de 72 horas (presente estudio)
- Cultivos de 48 horas, (estudio citogenético clásico en genotoxicidad)
- Cultivos de 96 horas con adición de afidicolina (apc), inhibidor de la DNA polimerasa (estudio de los mecanismos de reparación de DNA)
- Cultivos de 72 horas con adición de citocalasina B (Cyt-B) (obtención de células binucleadas y análisis de micronúcleos)

Todos estos cultivos se han realizado por duplicado, es decir, que para cada individuo se han llevado a cabo 8 cultivos celulares.

En el presente trabajo el estudio genotóxico se ha realizado en linfocitos cultivados durante 72 horas, mediante la técnica de cultivo habitualmente utilizada en nuestro laboratorio.

Previamente a realizar el cultivo celular, el medio base RPMI-1640 se suplementa, en condiciones estériles. A cada 100ml de medio base (que incluye glutamina y 25mM de Hapes) se le añade 20ml de suero fetal bovino (FCS) inactivado (mediante calor a 57°C durante 30 min), 2ml de penicilina/estreptomicina (100ui/ml) y 2ml de heparina sódica al 1% (1000ui/ml). Una vez homogenizada la mezcla, se procede a alicuotarla en tubos de 5ml, conservándolos a -20°C hasta el momento de su utilización. Antes del sembrado de la muestra, es necesario descongelar los tubos y añadir a cada uno 50µl de L-glutamina 200mM y 120µl fitohemaglutinina (mitógeno). A continuación, se siembran 250µl de sangre por tubo y se ponen a cultivar.

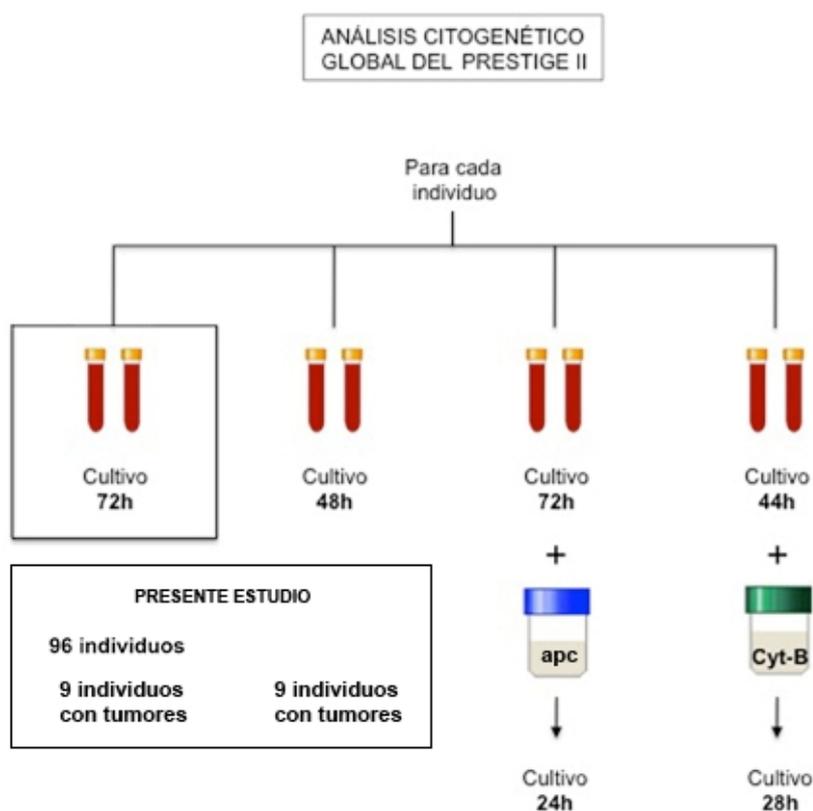


Figura 11. Los cuatro tipos de cultivos de linfocitos empleados en el estudio completo del Prestige II. (apc: afidicolina, Cyt-B: citocalasina B)

El cultivo celular se realiza en tubos inclinados durante 72h, a 37°C y al 5% de CO₂. Durante la incubación se agitan suavemente los tubos, dos veces al día. A las 71.30h de cultivo, se añaden 50µl de colcemid (0.1ng/ml) al cultivo y se continúa la incubación 30 min más a 37°C para bloquear las células en metafase.

Para la extracción del cultivo, en primer lugar, se centrifugan los tubos a 600g durante 8 min y se descarta el sobrenadante. Se realiza un tratamiento hipotónico con KCl 0,075M, añadiéndolo al tubo gota a gota, hasta un volumen aproximado de 7-10ml y se deja que actuar 15 min, a 37°C. A continuación, se centrifuga a 600g durante 8 min, descartando, de nuevo, el sobrenadante. Se realizan lavados con 7-10ml de Carnoy (proporción 3:1; metanol: ácido acético), dejándolo caer en el tubo, gota a gota y agitando con el vortex. Tras cada aplicación de Carnoy, se realizan centrifugados a 600g durante 8 min, se descarta el sobrenadante y se añade más solución. Se repiten los lavados hasta que el sobrenadante esté

limpio de hemoglobina. Tras el último centrifugado se añade unas gotas de Carnoy, recién hecho y la suspensión celular obtenida puede utilizarse inmediatamente para realizar extensiones cromosómicas o conservarse, durante años, a -20°C (Fig. 12).

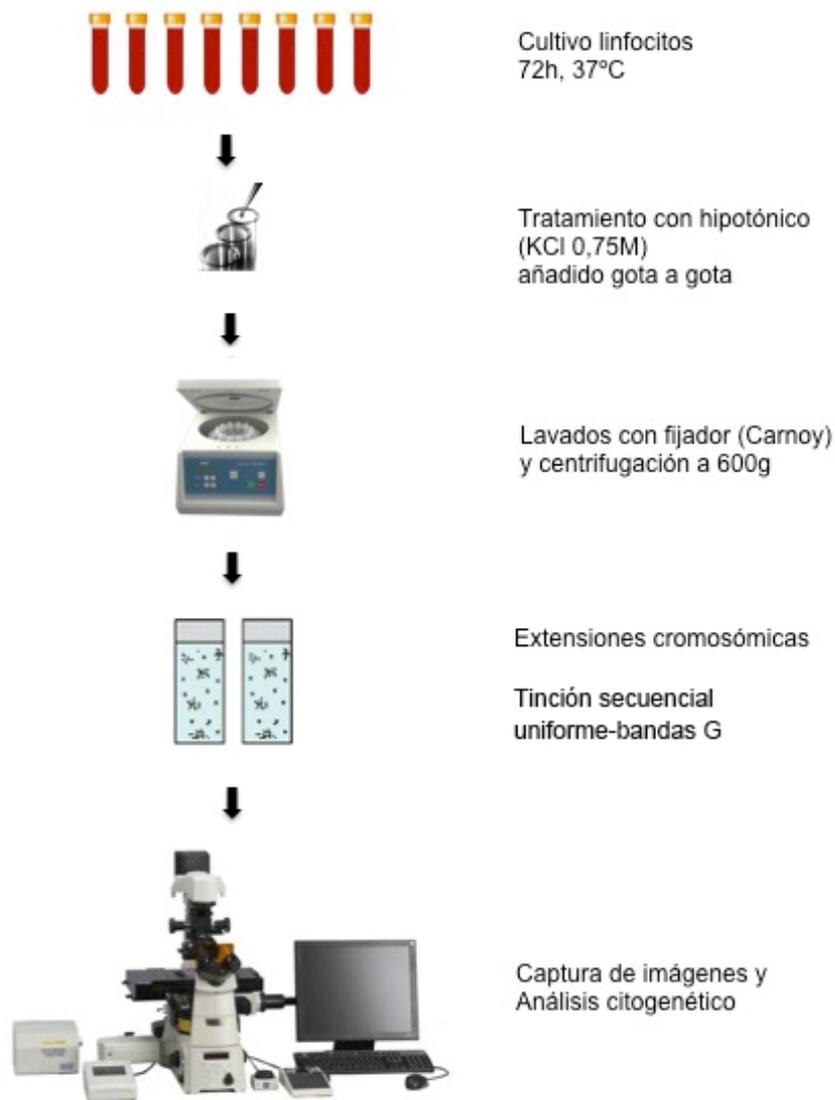


Figura 12. Protocolo de la técnica de cultivo de linfocitos

Una vez la suspensión celular esta bien limpia, se procede a realizar las extensiones cromosómicas. Los portaobjetos son previamente desengrasados en metanol al 100%, a -20°C para eliminar los posibles restos de suciedad y así conseguir buenas extensiones. Se

dejan caer 3-4 gotas de suspensión celular sobre un portaobjeto, desde 25-30 cm, con ayuda de una pipeta Pasteur y se dejan secar al aire. En aquellas muestras en las que no se obtienen buenas extensiones cromosómicas con la técnica habitual, se ha aplicado una pequeña modificación que consiste en centrifugar la suspensión celular y resuspender con un fijador diferente (metanol y ácido acético en proporción 3:2 en vez de 3:1). Posteriormente, se realiza la extensión sujetando el portaobjetos muy cerca de un baño a 65°C, de modo que la temperatura y la humedad del baño faciliten la extensión de la suspensión celular.

La extracción de cultivo de 48 horas en individuos con tumores se realizó de igual modo que para cultivos de 72 horas.

3.4. Tinción secuencial uniforme-bandas G

Tinción uniforme con colorante Leishman

La tinción uniforme de los cromosomas permite la observación del tamaño y morfología de los cromosomas, la posición de los centrómeros, la constricción secundaria de los cromosomas acrocéntricos y las dos cromátides de cada cromosoma. La tinción uniforme aún sigue siendo la mejor técnica para detectar lesiones cromosómicas ya que con las bandas G se puede confundir bandas claras con gaps y roturas (Figs. 13 y 14). Con esta tinción también se puede detectar alteraciones cromosómicas estructurales aparentes, tales como anillos, fragmentos acéntricos o cromosomas dicéntricos.

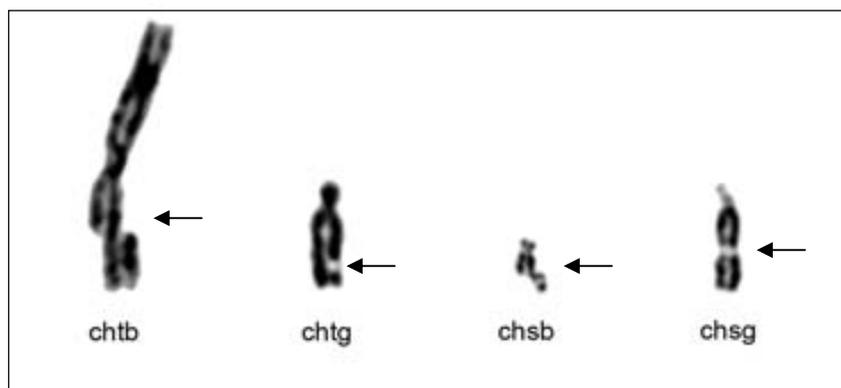


Figura 13. Tipo de lesiones cromosómicas detectadas con tinción uniforme: De izquierda a derecha: rotura de cromátide (ch**tb**), gap de cromátide (ch**tg**), rotura de cromosoma (ch**sb**) y gap de cromosoma (ch**sg**).

El protocolo empleado para la tinción uniforme es el habitual en nuestro laboratorio. Se

añade sobre cada portaobjetos con la extensión cromosómica, aproximadamente 5ml de solución de Leishman (en proporción 1:4, colorante Leishman, tampón Leishman) y se deja actuar 5-6 min. Se lavan los portaobjetos con agua para eliminar el colorante y se dejan secar al aire. Es aconsejable preparar la solución de Leishman en el momento de su utilización para conseguir una mejor tinción.

Bandas G

Previamente a la aplicación de la técnica de bandas, se envejecen las preparaciones teñidas con tinción uniforme, incubándolas toda la noche a 65°C o dejándolas 2 horas, a 65°C. A continuación, se destiñen las preparaciones sumergiéndolas en una cubeta con solución salina 2xSSC (citrato trisódico disuelto en NaCl 0.3M) durante 1-2 min, a 65°C. Seguidamente, se lavan con agua y se dejan secar.

Las bandas cromosómicas se obtienen añadiendo a las preparaciones solución Wright (Sigma) al 0.25% (1:3, colorante Wright, buffer Sörensen)* dejando la actuar de 3 a 5 minutos, dependiendo de las características de la muestra, principalmente, de la cantidad de citoplasma presente en las células. Se lavan con agua para eliminar el colorante y se dejan secar. A continuación, se observan la preparaciones en el microscopio óptico para controlar la calidad de las bandas. En caso de no obtener bandas o que estén poco definidas, cabe la posibilidad de volver a teñir con solución Wright. Las preparaciones bandeadas pueden guardarse indefinidamente a 4°C (ver Fig. 14).

* Colorante Wright: 2.5g colorante Wright disuelto en 1000 ml metanol, agitación magnética durante 45 min, filtrado y envejecido durante 3 días a 37°C. Buffer Sörensen: 5,94 g Na₂HPO₄·2 H₂O y 4.54 g KH₂PO₄ en un 1L dH₂O.

3.5. Análisis citogenético

Para la observación de las preparaciones cromosómicas con tinción uniforme y bandas G se ha utilizado un microscopio óptico (Nikon Eclipse 90i). El microscopio esta dotado de una camera CCD (charged coupled device) de alta sensibilidad (Nikon) que esta conectada a un ordenador, equipado con el programa de captura de imágenes Metasystems y un software específico para capturar y cariotipar (Ikaros).

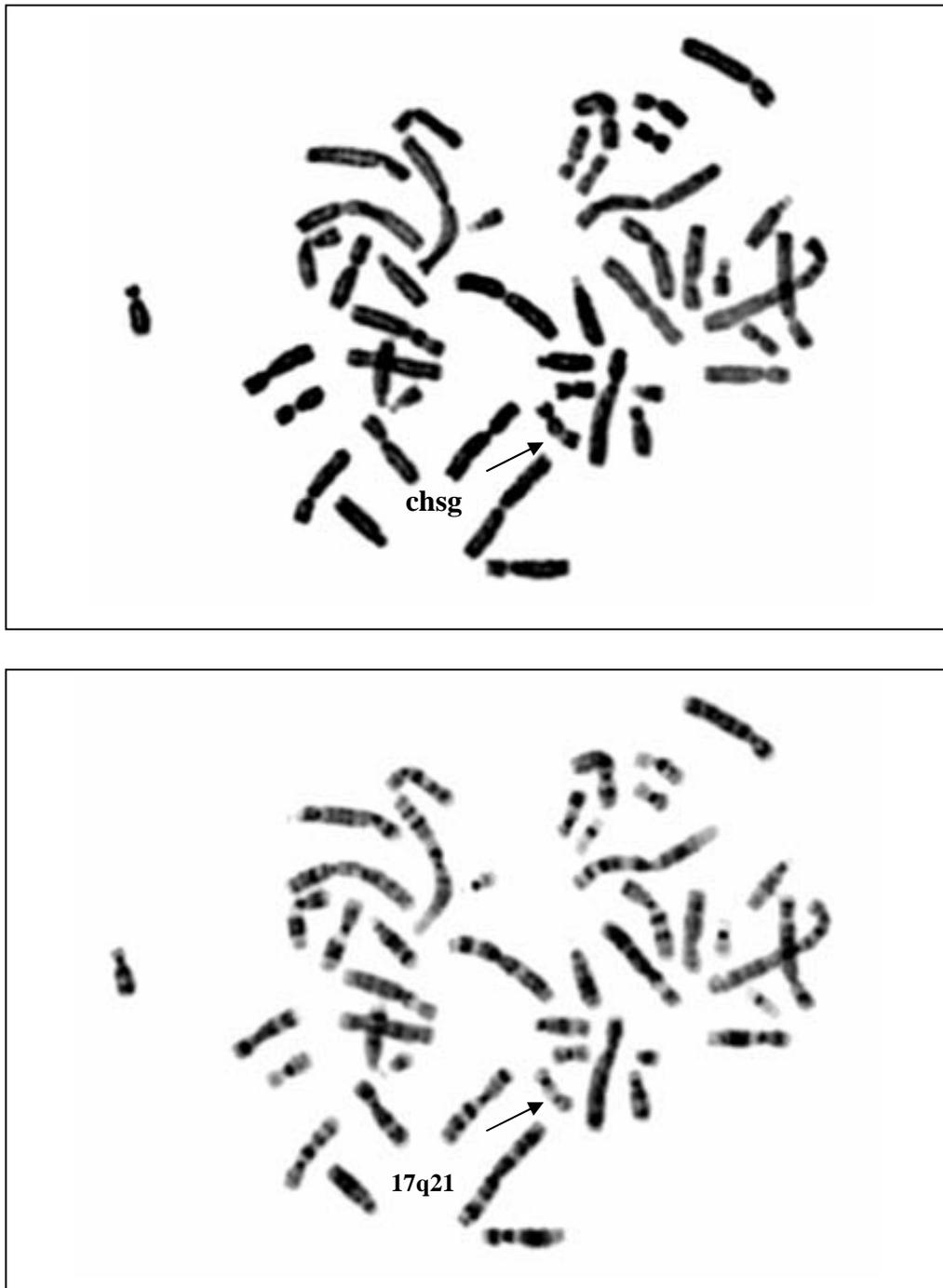


Figura 14. La misma metafase tratada con tinción secuencial uniforme (arriba) y bandas G (abajo). La flecha señala un gap de cromosoma (chsg), que se localiza en la banda 17q21. Nótese que el gap se visualiza mejor con tinción uniforme que con bandas G.

Lesiones cromosómicas

Se seleccionan metafases de buena calidad, es decir, con poco citoplasma y con cromosomas bien extendidos (pocos solapamientos). Se capturan las metafases con lesiones cromosómicas o alteraciones cromosómicas estructurales, apuntando las coordenadas correspondientes para poderlas volver a localizar una vez realizado el bandeo cromosómico.

Para el estudio de lesiones cromosómicas con tinción uniforme se han analizado un mínimo de 100 metafases por individuo.

Alteraciones cromosómicas

Las metafases con lesiones cromosómicas (detectadas previamente con tinción uniforme de las que se dispone de las coordenadas) se vuelven a capturar para determinar el punto exacto de la lesión detectada. Así mismo, a partir de estas mismas preparaciones se realizan cariotipos con bandas con el fin de detectar e identificar alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas.

Para el análisis de alteraciones cromosómicas se ha realizado el cariotipo de un mínimo de 25 metafases de buena calidad, por individuo.

Nomenclatura

Las lesiones y las alteraciones cromosómicas se han clasificado de acuerdo con los criterios descritos por International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009). El análisis citogenético se ha realizado, como mínimo, por dos investigadores.

3.6. Análisis estadístico

A continuación detallamos los diferentes métodos estadísticos que se han aplicado en este trabajo, según los diferentes parámetros a evaluar.

Comparación de resultados citogenéticos entre los grupos E y NE

Se ha aplicado el test de Chi cuadrado, con el programa informático InStat 2, para evaluar los resultados citogenéticos obtenidos en los grupos E y NE. Un valor $p < 0.05$ se ha considerado como estadísticamente *significativo*.

Asociación entre exposición al fuel y daño cromosómico

Se ha evaluado si existe, o no, una asociación entre el daño cromosómico y el grado de exposición al fuel, en función de los siguientes variables: tiempo de participación, tipo de trabajo realizado, horas al día de participación y frecuencia de uso de la máscara durante la realización del trabajo.

Para este análisis se ha aplicado el modelo GEE, ajustado por edad y sexo. El modelo GEE, “Ecuaciones de Estimación Generalizados”, tiene en cuenta las variaciones dentro de un mismo individuo y además no necesita que todos los individuos tengan el mismo número de medidas repetidas (de la Chica *et al.*, 2005; Monyarch, 2010). Los resultados del modelo GEE se expresan en termino de *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza del 95%. La OR es una medida estadística que describe la fuerza de asociación entre datos binarios.

En nuestro caso la OR indica el coeficiente entre la posibilidad de daño cromosómico en el grupo E y la posibilidad de daño cromosómico en el grupo NE. El valor OR indica cuantas veces más grande es la posibilidad de daño cromosómico en el grupo E respecto al grupo NE. Si OR es > 1 significa que hay una asociación positiva entre exposición y daño cromosómico.

El análisis estadístico del modelo GEE se realizó con el programa STATA ES10,0 (STATA Corporation, Collage Station, TX, USA).

Cromosomas y bandas cromosómicas más implicadas en la exposición al fuel

Para identificar los cromosomas y bandas más implicadas en la exposición al fuel se han utilizado dos métodos diferentes:

- a) Longitud relativa de cromosomas/bandas cromosómicas
- b) Método multinomial para el estudio de lugares frágiles (*Fragile site multinominal method, FSM*)

a) Longitud relativa de cromosomas y bandas cromosómicas

Para determinar si las roturas se distribuyen proporcionalmente a la longitud de los cromosomas o bandas cromosómicas (a mayor longitud mayor número de roturas), hemos utilizado un método estadístico que tiene en cuenta la longitud relativa de cada cromosoma/banda cromosómica.

El tamaño de cada cromosoma y banda se ha obtenido a partir de los datos del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*), versión 36.3 del *Map Viewer*. La longitud

del genoma haploide según esta base de datos es de 3079 Mb. El tamaño de cada cromosoma y de sus respectivos brazos se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de los 24 cromosomas en megabases (Mb)¹

	Total (Mb)	Braza p (Mb)	Braza q (Mb)
Cromosoma 1	247	124	123
Cromosoma 2	243	93	150
Cromosoma 3	200	92	108
Cromosoma 4	191	51	140
Cromosoma 5	181	48	133
Cromosoma 6	171	61	110
Cromosoma 7	159	59	100
Cromosoma 8	146	45	101
Cromosoma 9	140	52	88
Cromosoma 10	135	40	95
Cromosoma 11	134	53	81
Cromosoma 12	132	35	97
Cromosoma 13	114	16	98
Cromosoma 14	106	16	90
Cromosoma 15	100	16	84
Cromosoma 16	89	38	51
Cromosoma 17	79	22	57
Cromosoma 18	76	16	60
Cromosoma 19	64	29	35
Cromosoma 20	62	27	35
Cromosoma 21	47	12	35
Cromosoma 22	50	12	38
Cromosoma X	155	60	95
Cromosoma Y	58	12	46
Total Genoma	3079		

¹ NCBI, versión 36.3 del *Map Viewer*

Con estos datos podemos valorar si la diferencia entre el valor observado y esperado es significativa. Si sabemos que la longitud de todos los cromosomas es 3079 Mbp y que los puntos de roturas totales en los individuos E son 162, se puede, con una simple regla de tres, calcular el valor de roturas esperadas por cromosoma o banda cromosómica. Así por ejemplo, en el grupo E el cromosoma 1 (247 Mb de longitud) presenta 16 roturas, frente a las 13 esperadas ($247 \times 162 / 3079$). El test de Chi cuadrado permite conocer si la diferencia entre el valor observado y esperado es significativo, aplicando la corrección de Sidak para

múltiples comparaciones. El mismo cálculo se realiza para cada banda cromosómica en la que se localizaban roturas.

b) Método FSM

Este método se ha aplicado para evaluar si existen bandas con más daño cromosómico en los grupos E y NE. El programa estadístico FSM (versión 995), utilizado con MS-DOS, está diseñado para detectar lugares frágiles y calcula si la probabilidad de una rotura es igual o no, en las 400 bandas cromosómicas del cariotipo (Greenbam *et al.*, 1997), independientemente de su tamaño. Es decir, el programa valora si una banda concreta se ha roto debido al azar o existe una predisposición a sufrir roturas. El modelo está diseñado para células inducidas por afidicolina requiriendo que cada individuo tenga por lo menos 200 bandas con roturas.

En nuestro estudio se ha realizado un ajuste del programa estadístico asumiendo que todas las bandas afectadas de los individuos E son de una persona y todas las bandas afectadas de los individuos NE son de otra persona, es decir hacer creer al programa que solo se hayan estudiado dos personas, una de ellas E y la otra NE (de la Chica *et al.*, 2005., Monyarch., 2010). De esta forma, se puede utilizar en series de individuos que presentan valores inferiores a 200 bandas con roturas.

3.7. Individuos con cáncer

De los individuos estudiados en el proyecto global del Prestige I, siete han desarrollado cáncer en los 4 años transcurridos, hasta realizar el estudio de seguimiento. Estos individuos han sido estudiados como un grupo aparte dado que uno de los criterios de selección para el estudio genotóxico era que los individuos en el estudio no podían tener cáncer. También se han incluido en este grupo dos individuos con tumores benignos. Las características de este grupo se indican en la Tabla 4.

El estudio citogenético se ha llevado a cabo a “a ciegas” sin conocer que tenían cáncer. Los criterios utilizados en el análisis de lesiones y alteraciones cromosómicas han sido los mismos que para el resto de individuos estudiados. Además del estudio en cultivos de linfocitos de 72 se han analizado cultivos de 48h con el fin de conocer si el daño cromosómico, tipo de alteración y bandas afectadas era o no equivalente.

Tabla 4. Características de los individuos en el subgrupo de cáncer

Individuo	Cofradía	Edad	Sexo	E/NE	Tipo de cáncer	Cirugía	Quimio	Radio
1	Miño	49	XX	NE	Piel	X		
2	Rianxo	49	XX	E	Mama y útero	X		
3	Fisterra	57	XY	E	Próstata	X		
4	Fisterra	43	XY	E	Colon	X	X	X
5	Cabo de cruz	43	XY	E	Tumor benigno			
6	Corcubión	61	XY	E	Próstata	X		
7	Camariñas	46	XX	E	Vejiga	X	X	
8	Camariñas	51	XY	E	Tumor benigno			
9	Aguiño	37	XY	E	Piel	X		

4. Resultados

En este trabajo se han estudiado 105 pescadores y mariscadores gallegos expuestos (E) y no expuestos (NE) al fuel vertido por el buque Prestige: 96 han sido incluidos en el estudio de seguimiento del Prestige I y 9 han sido estudiados en un grupo aparte porque presentaban tumores (Grupo de cáncer). En total, se han analizado 11.651 metafases con tinción uniforme-bandas G y 3130 cariotipos para la detección de lesiones cromosómicas y alteraciones cromosómicas, respectivamente.

4.1. Características de los individuos del estudio de seguimiento

De los 96 individuos estudiados en este apartado, 75 habían sido previamente analizados en el estudio del Prestige I, a los 2 años de la exposición al fuel. Las cofradías de pescadores que han colaborado en el presente estudio (Tabla 5) pertenecen a localidades

Tabla 5. Cofradías de pescadores que han participado en el presente estudio y grado de exposición al fuel

Cofradía	Individuos
Zonas muy expuestas (Grupo E)	52
Camelle	1
Corme	6
Fisterra	11
Carnota	3
Corcubión	5
Camariñas	22
Muxia	1
Laxe	1
Cabo de cruz	2
Zonas poco expuestas (Grupo NE)	44
Mugrados	10
Miño	12
Pontedeume	6
Espesante	5
Foz	3
Barallobre	1
Lobre	2
Cedeira	1
San Ciprian	1
Celeiro	3

gallegas, 9 muy contaminadas por el fuel (grupo E) y 10 menos afectadas (grupo NE). Sólo una vez finalizado el análisis citogenético, realizado a ciegas, se conoció que 52 individuos eran E y 44 NE.

El grado de exposición al fuel de los individuos expuestos durante las labores de limpieza fue variable, dependiendo del tiempo dedicado (horas/día), del tipo y número de tareas de limpieza y la frecuencia de utilización de medios de protección (mascarillas). Aunque en general todos los individuos del grupo E fueron los más expuestos (ver criterios de selección 3.1) se han clasificado los expuestos en dos grupos “poco expuestos” y “muy expuestos”

- Poco expuestos: trabajo entre 15-100 días, de 4-6 horas al día, de 1-4 tareas, frecuente utilización de medidas de protección.
- Muy expuestos: trabajo > 100 días, > 6 horas al día, > de 5 tareas, poca o nula utilización de medidas de protección.

De los individuos E un 54% (28/52) estuvieron poco expuestos y 46% (24/52) muy expuestos.

En las labores de recogida de fuel han participado más mujeres (74%) que hombres (26%). Este predominio de mujeres se observa en ambos grupos E y NE (Tabla 6), no existiendo una asociación entre exposición al fuel y sexo ($p=0,64$).

Tabla 6. Sexo de los participantes del estudio de seguimiento Pretige II

	Grupo E		Grupo NE		Total		p
	n	%	n	%	n	%	
Total individuos	52		44		96		
Sexo							
Hombres	15	29	10	23	25	26	0,64
Mujeres	37	71	34	77	71	74	

La edad media en los grupos E y NE era similar: 53,6 y 56,3 respectivamente (Tabla 7). Al separar los grupos E y NE en hombres y mujeres la distribución de edad era diferente. En el grupo E, las mujeres tenía, de media, 9,7 años más que los hombres ($p=0,001$) y en el grupo NE esta diferencia era de 7 años de media ($p=0,054$). La edad media de las

mujeres era muy parecida en el grupo E, y NE (56,6 y 57,9, respectivamente), así como la de los hombres (46,9 y 50,9 respectivamente) (Tabla 8).

La tabla 9 de muestra los rangos de edad, de los dos grupos, entre mujeres y hombres.

Tabla 7. Edad de los participantes del estudio de seguimiento Prestige II

	n	Edad media \pm DS	Edad mínima	Edad máxima	p
Edad	96	55,2 \pm 8	33	69	0,123
Grupo E	52	53,6 \pm 9	33	68	
Grupo NE	44	56,3 \pm 8	35	69	

Tabla 8. Diferencias en edad y sexo en los grupos E y NE

	n	Grupo E	Grupo NE	p
Mujeres	81	56,6 \pm 7,3	57,9 \pm 6,6	0,549
Hombres	25	46,9 \pm 9,1	50,9 \pm 9,9	0,363
p		0,001	0,054	

Tabla 9. Rango de edad por grupo y sexo en los grupos E y NE

	Mujeres		Hombres	
	Grupo E	Grupo NE	Grupo E	Grupo NE
Total individuos	37	34	15	10
Edad				
30-40	1	0	4	2
40-50	7	7	6	2
<50	29	27	5	6

4.2. Análisis citogenético

Los resultados citogenéticos obtenidos para cada uno de los individuos, del grupo E y NE, se detallan en el anexo 1 y 2.

4.2.1. Análisis de metafases con tinción uniforme

Lesiones cromosómicas

Se han analizado un total de 9886 metafases de linfocitos. En la Tabla 10 se muestra la frecuencia y el tipo de lesión observada en los grupos E y NE.

Tabla 10. Frecuencia y tipo de lesiones detectadas en los grupos E y NE

	Grupo E		Grupo NE		p
	n	%	n	%	
Individuos	52		44		
Metafases analizados	5346		4540		
Metafases con lesiones	105	2,0	93	2,0	0,82
Lesiones cromosómicas	112	2,0	112	2,5	0,24
Gaps	81	1,5	90	2,0	0,08
de cromátide	57	70,4	60	66,7	
de cromosoma	24	29,6	30	33,3	
Roturas	31	0,6	22	0,5	0,61
de cromátide	4	12,9	6	27,3	
de cromosoma	27	87,1	16	72,7	

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos para ninguno de los tres parámetros analizados: número de metafases con lesiones (2,0 vs 2,0, $p=0,82$), número total de gaps (1,5 vs 2,0, $p=0,08$) y número total de roturas (0,6 vs 0,5, $p=0,61$).

Alteraciones cromosómicas estructurales

Con la tinción uniforme, además de lesiones cromosómicas, se han detectado algunos tipos de alteraciones estructurales, tales como los anillos, fragmentos acéntricos y translocaciones (Fig. 15).



Figura 15. Metafasas con tinción uniforme con alteraciones cromosómicas estructurales (flechas). A la izquierda, un cromosoma en anillo y a la derecha una translocación dicéntrica y fragmentos acéntricos.

La Tabla 11 muestra la frecuencia y el tipo de alteraciones cromosómicas estructurales detectadas en el grupo E y NE con tinción uniforme. En ambos grupos, la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales era similar ($p=0,45$).

Tabla 11. Frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas estructurales detectadas con tinción uniforme

	Grupo E		Grupo NE		p
	n	%	n	%	
Individuos	52		44		
Metafasas analizadas	5346		4540		
Alteraciones cromosómicas estructurales	13	0,24	7	0,15	0,45
Fragmentos acéntricos	2		5		0,33
Translocaciones no equilibradas	0		1		0,93
Translocaciones dicéntricas	4		1		0,47
Cromosomas en anillo	2		0		0,55
Cromosomas marcadores	5		0		0,11

4.2.2. Análisis de metafases con bandas G

Lesiones cromosómicas

La tinción secuencial uniforme-bandas G ha permitido identificar el 79,9% (179/224) de todas las bandas cromosómica con lesiones (79.7% gaps y 81.6% roturas).

Alteraciones cromosómicas estructurales

Se han analizado un mínimo de 25 cariotipos por individuo (rango de 25 a 49 cariotipos) con un total de 2741 metafases cariotipadas. La Tabla 12 muestra la frecuencia y tipo de alteraciones estructurales observadas en ambos grupos (Figuras 16 y 17).

Tabla 12. Frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas estructurales identificadas con bandas G

	Grupo E		Grupo NE		p
	n	%	N	%	
Individuos	52		44		
Metafases cariotipadas	1481		1260		
Metafases con alteraciones estructurales	78	5,3	75	5,9	0,49
Alteraciones cromosómicas estructurales	98	6,6	87	6,9	0,82
Equilibradas	2		1		0,66
Translocaciones recíprocas	2		1		0,66
Desequilibradas	96		86		0,78
Deleciones	35		28		0,91
Deleciones + ace ¹	10		4		0,30
Fragmentos acéntricos	3		8		0,14
Translocaciones no equilibradas	8		3		0,35
Translocaciones dicéntricas	7		1		0,12
Translocaciones dicéntricas + del ² + ace	0		1		0,99
Translocaciones + del	0		2		0,47
Cromosomas en anillo	3		1		0,73
Cromosomas marcadores	30		38		0,12

¹ ace= fragmento acéntrico, ²del= deleción

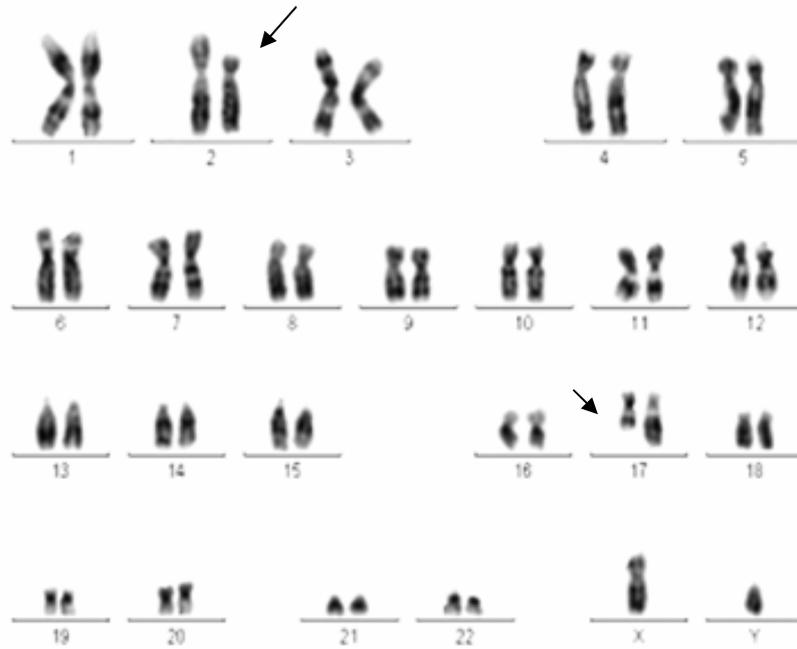


Figura 16. Cariotipo con una translocación recíproca: 46,XY,t(2;17) (p14;q23) (individuo NE-306)

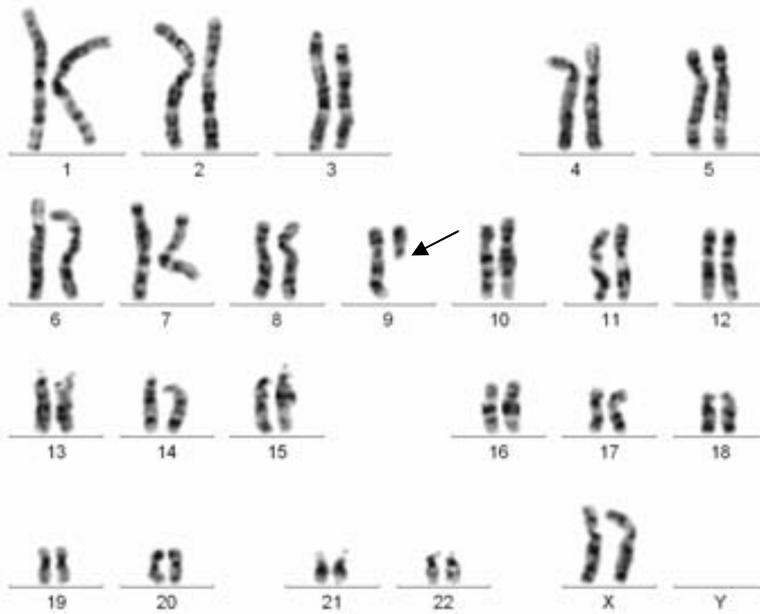


Figura 17. Cariotipo con una deleción: 46,XX,del9q21 (individuo E-233)

El cariotipo ha sido normal en todos los individuos (46, XX o 46, XY), excepto en una mujer (NE-201) que presentaba una deleción en el cromosoma X en mosaico, con cariotipo: 46,X,del(X)(q22.2)[37]/45,del(X)(q22.2)[5]/ 46,XX[3].

En ambos grupos la mayoría de las alteraciones observadas son desequilibradas, siendo las deleciones y los cromosomas marcadores los más frecuentes. El total de alteraciones cromosómicas estructurales de los grupos E y NE no presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p=0,82$).

Alteraciones cromosómicas numéricas

El total de alteraciones numéricas era similar en el en el grupo E (15,6 %) y en el NE (18,1%) (Tabla 13). En ambos grupos las monosomías eran las alteraciones numéricas más frecuentes (85.3% en el E vs 87.3% en el NE) aunque este tipo de alteraciones puede ser debido, al menos en parte, por una pérdida artefactual de cromosomas durante la obtención de las extensiones.

Tabla 13. Frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas numéricas identificadas con bandas G

	Grupo E		Grupo NE		p
	n	%	n	%	
Individuos	52		44		
Metafasas cariotipadas	1481		1260		
Metafasas con alteraciones numéricas	203	13,7	201	15,9	0,11
Alteraciones numéricas	231	15,6	228	18,1	0,09
Trisomías	34	2,3	29	2,9	0,99
Monosomías	197	13,3	199	15,8	0,07

La Tabla 14 muestra las trisomías y monosomías para cada cromosoma detectado en los grupos E y NE. En ambos grupos, la trisomía X y las monosomías 9, 18, 19, 21, 22 y X son las más frecuentes.

Tabla 14. Frecuencia de aneuploidía por cromosoma en individuos E y NE

Cromosoma	Grupo E		Grupo NE		p
	Trisomía	Monosomía	Trisomía	Monosomía	
1	0	2	1	1	
2	0	2	2	2	
3	2	3	1	5	
4	0	2	0	2	
5	2	2	0	4	
6	1	5	0	3	
7	2	3	1	4	
8	1	2	1	8	
9	0	12	1	13	
10	0	5	0	5	
11	0	6	1	7	
12	1	3	1	5	
13	1	1	1	6	
14	0	7	0	4	
15	0	9	1	5	
16	0	8	1	6	
17	1	4	0	8	
18	2	18	0	11	
19	1	21	0	22	
20	0	8	2	16	
21	3	19	2	16	
22	4	19	2	13	
X	13	35	9	32	
Y	0	1	2	1	
Total trisomías	34	-	29	-	0.99
Total monosomías	-	197	-	199	0.07

4.2.3. Identificación de polimorfismos cromosómicos

Cuatro individuos del grupo E presentaban polimorfismos cromosómicos en su cariotipo. Los polimorfismos detectados han sido: la inversión pericéntrica del cromosoma 9, el tamaño de la región de heterocromatina del cromosoma 1 y cromosoma 16 y el tamaño de satélites en cromosoma 22 (Fig. 18).

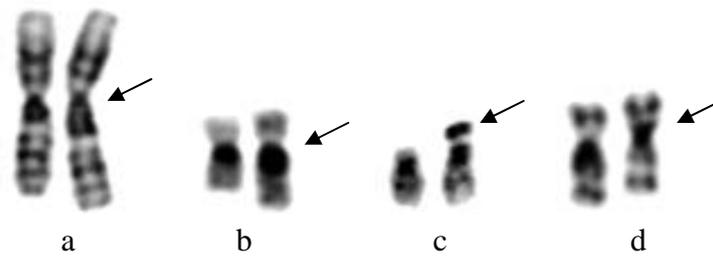


Figura 18. Polimorfismos cromosómicos detectados en nuestro estudio: a) tamaño de la heterocromatina centromérica del cromosoma 1; b) tamaño de la heterocromatina centromérica en el cromosoma 16; c) tamaño de los satélites del cromosoma 22; y d) inversión pericéntrica del cromosoma 9 (las flechas señalan el cromosoma polimórfico)

4.2.4. Asociación entre exposición y daño cromosómico: Efecto “dosis-respuesta”

Para analizar la asociación entre lesiones cromosómicas y alteraciones estructurales con la exposición al fuel en ambos grupos, E y NE (modelo estadístico GEE) se ha tenido en cuenta el número de individuos E y NE que presentaban al menos una lesión y se ha comparado este valor con los que no presentaban ninguna (Tablas 15 y 16). En el caso de las lesiones sólo se ha observado asociación entre roturas de cromosoma y exposición al fuel, mientras que en alteraciones estructurales esta asociación se observaba en alteraciones equilibradas y cromosomas en anillo.

El efecto “dosis-respuesta”, es decir, si el grado de exposición (“poco expuestos” y “muy expuestos”) está asociado con un incremento de lesiones cromosómicas y alteraciones estructurales (modelo GEE) se muestran en las Tablas 17 y 18. Los resultados no reflejaban diferencias entre grado de exposición y lesiones cromosómicas o alteraciones cromosómicas estructurales

Tabla 15. Asociación entre exposición al fuel y lesiones cromosómicas por individuo

	Grupo E		Grupo NE		OR ^{1,2} (95% CI)
	n	%	n	%	
Ninguna lesión cromosómica	10		8		1 (ref)
Alguna lesión cromosómica	42	80,8	36	81,8	0,9 (0,7-1,2)
Gaps	36	78,3	34	81,0	0,9 (0,6-1,2)
de cromátide	34	77,3	31	79,5	0,9 (0,6-1,3)
de cromosoma	17	63,0	18	69,2	0,9 (0,5-1,6)
Roturas	21	67,7	13	61,9	1,0 (0,6-1,8)
de cromátide	4	28,6	6	42,9	0,7 (0,2-2,5)
de cromosoma	20	66,7	10	55,6	1,1 (0,6-2,1)

¹ Grupo de referencia: Ninguna lesión cromosómica

² Modelo ajustado por edad y sexo

Tabla 16. Asociación entre exposición al fuel y alteraciones cromosómicas estructurales por individuo

	Grupo E		Grupo NE		OR ^{1,2} (95% CI)
	n	%	n	%	
Ninguna alteración cromosómica estructural	15		11		1 (ref)
Alguna alteración cromosómica estructural	37	71,2	33	75,0	0,8(0,6-1,1)
Alteraciones equilibradas	3	16,7	1	8,3	1,8(0,2-18,7)
Alteraciones desequilibradas	36	70,6	33	75,0	0,8(0,6-1,1)
Deleciones	28	65,1	23	67,6	0,9(0,6-1,4)
Translocaciones	9	37,5	10	47,6	0,9(0,4-2,1)
Cromosomas en anillo	3	16,7	1	8,3	1,7(0,2-17,0)
Fragmentos acéntricos	12	44,4	10	47,6	0,8(0,3-1,8)
Cromosomas marcadores	18	54,5	19	63,3	0,7(0,4-1,3)

¹ Grupo de referencia: Ninguna alteración cromosómica estructural

² Modelo ajustado por edad y sexo

Tabla 17. Asociación entre grado de exposición y lesiones cromosómicas

	n	Lesión	%	OR ^{1,2} (95% IC)
Lesiones cromosómicas				
No expuesto	44	36	81,8	1 (ref)
Poco Expuesto	28	23	82,1	0,9 (0,7-1,3)
Muy expuesto	24	19	79,2	0,8 (0,6-1,2)
Gaps				
No expuesto	42	34	81,0	1 (ref)
Poco Expuesto	25	20	80,0	0,9 (0,6-1,4)
Muy expuesto	21	16	76,2	0,8 (0,5-1,2)
Roturas				
No expuesto	21	13	61,9	1 (ref)
Poco Expuesto	15	10	66,7	1,0 (0,5-2,0)
Muy expuesto	16	11	68,8	1,0 (0,5-2,0)

¹ Grupo de referencia: Ninguna lesión cromosómica

² Modelo ajustado por edad y sexo

Tabla 18. Asociación entre grado de exposición al fuel y alteraciones cromosómicas estructurales

	n	Alteración	%	OR ^{1,2} (95% IC)
Alteración cromosómica estructural				
No expuesto	44	33	75,0	1 (ref)
Poco Expuesto	28	21	75,0	0,9 (0,6-1,3)
Muy expuesto	24	16	66,7	0,7 (0,5-1,1)
Alteración equilibrada				
No expuesto	12	1	8,3	1 (ref)
Poco Expuesto	9	2	22,2	2,5 (0,2-28,7)
Muy expuesto	9	1	11,1	1,0 (0,1-19,1)
Alteración desequilibrada				
No expuesto	44	33	75,0	1 (ref)
Poco Expuesto	27	20	74,1	0,9 (0,6-1,3)
Muy expuesto	24	16	66,7	0,7 (0,5-1,1)

¹ Categoría de referencia: Ninguna alteración cromosómica estructural

² Modelo ajustado por edad y sexo

4.3. Cromosomas y bandas cromosómicas afectadas por la exposición al fuel

La técnica secuencial uniforme-bandas G ha permitido localizar, de forma precisa, 277 puntos de rotura involucrados en lesiones y alteraciones estructurales.

4.3.1. Cromosomas y brazos cromosómicos

Para identificar los cromosomas más afectados por la exposición al fuel se ha utilizado el análisis estadístico que tiene en cuenta la longitud relativa de cada cromosoma.

Los 162 puntos de rotura del grupo E y los 115 puntos del grupo NE no se distribuyen de forma uniforme, si no que se localizan con mayor frecuencia en determinados cromosomas, independientemente de su tamaño. En los individuos E, el cromosoma con más roturas era el 17 (11 roturas frente a las 4 esperadas por azar, teniendo en cuenta la longitud del cromosoma) ($p=0,0008$). En el grupo NE, los cromosoma 16 y 2 eran los más afectados (7 y 15 roturas frente a las 3 y 9 esperadas, respectivamente) ($p= 0,04$ y $p=0,05$), (Figura 19). Los cromosomas 21, 22 e Y en el grupo E y 19, 21 e Y en el grupo NE no presentaban roturas.

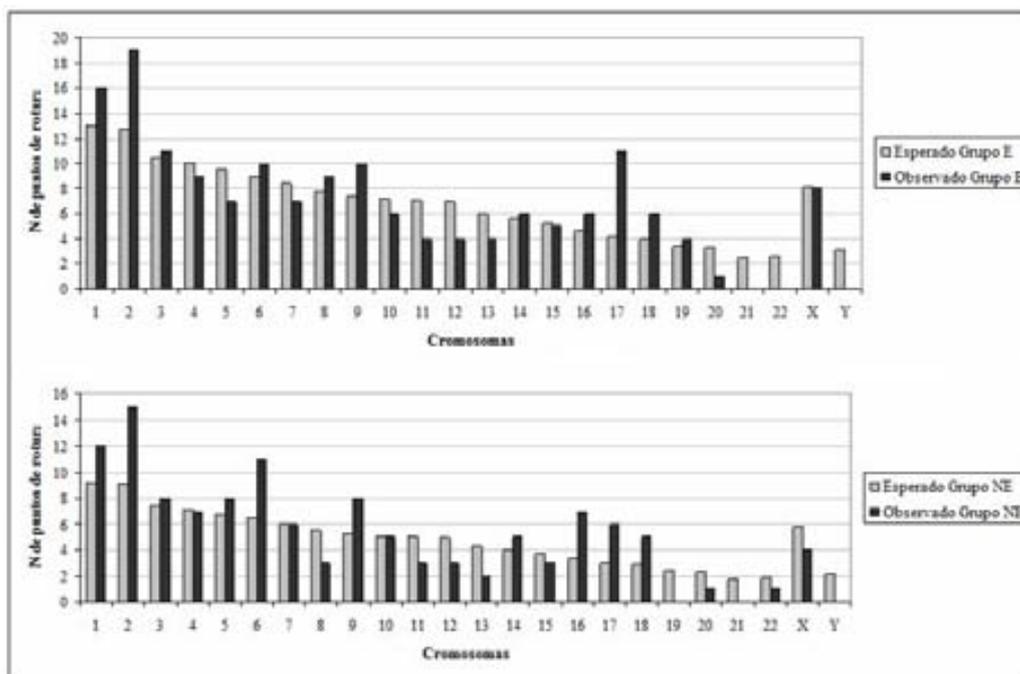


Figura 19. Distribución de los puntos de rotura observados y esperados en los diferentes cromosomas en el grupo E (arriba) y grupo NE (abajo). En el grupo E, el cromosoma 17 y en el grupo NE los cromosomas 2 y 16 presentan un mayor número de roturas que el esperado.

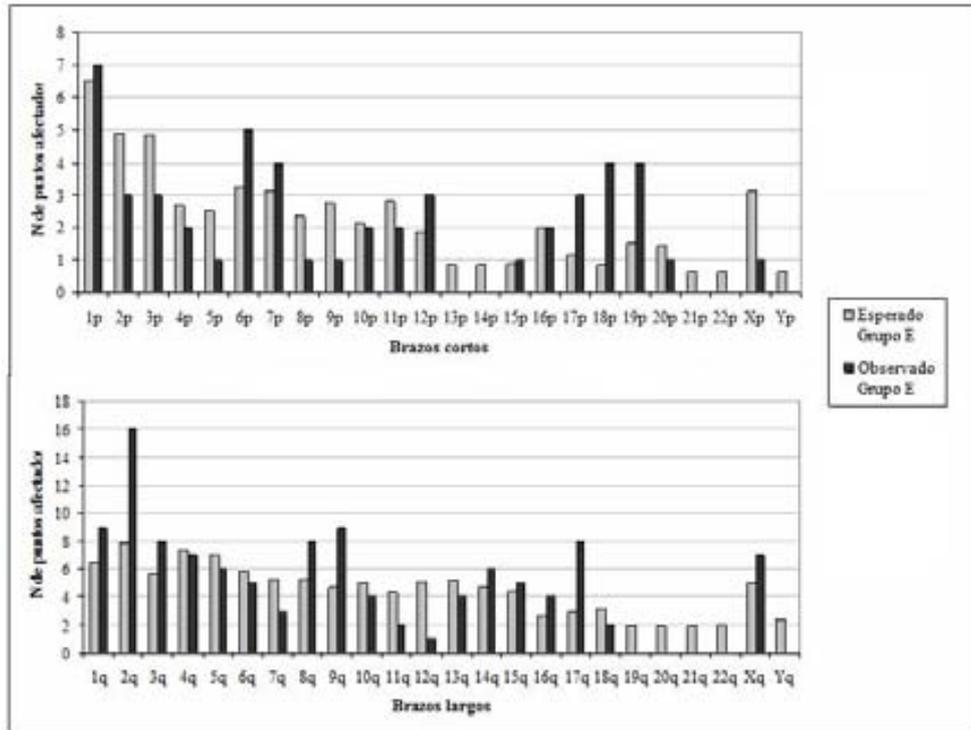


Figura 20. Distribución de los puntos de rotura observados y esperados en los brazos cromosómicos del grupo E.

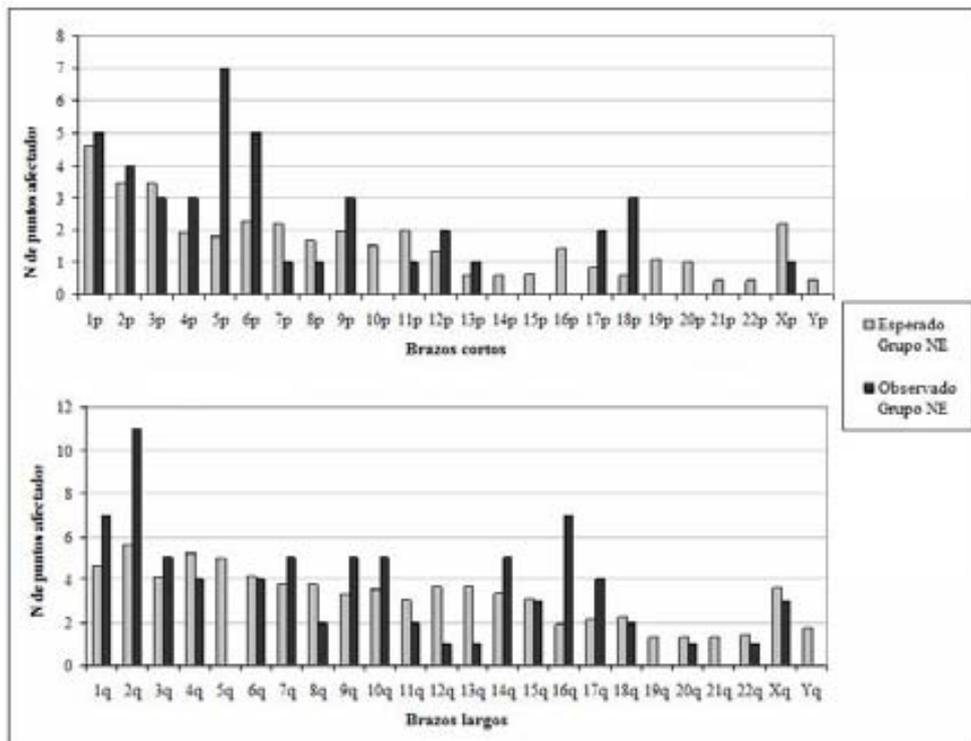


Figura 21. Distribución de los puntos de rotura observados y esperados en los brazos cromosómicos del grupo NE

En la Figura 20 se muestra la distribución de los puntos de rotura observados y esperados por brazo cromosómico en el grupo E. Los brazos cortos más afectadas han sido: 18p y 19p ($p < 0,05$) y los brazos largos: 2q, 9q y 17q ($p < 0,05$). En el grupo NE, Figura 21, los brazos cortos 5p y 18p presentan más puntos de rotura de lo que se esperaría por su longitud con valor $p < 0,002$. De los brazos largos, los más afectados han sido 2q y 16q ($p < 0,02$).

4.3.2. Bandas cromosómicas

La distribución de los puntos de rotura observados en los grupos E y NE se muestran en el ideograma con 400 bandas de resolución de la Figura 22. Hay 22 bandas con más de 3 roturas: 14 pertenecen al grupo E (1q32, 2q21, 2q35, 4q31, 5q31, 6q21, 7q22, 8q21, 9q22, 14q24, 17p112, 17q21, 18p112, 19p13) y 8 al grupo NE (2q23, 5q31, 6p21, 7q32, 14q24, 16q22, 16q23, 18p112). Las bandas comunes en ambos grupos son; 5q31, 14q24, 18p112. Para identificar de forma precisa las bandas cromosómicas más afectadas por la exposición al fuel se ha empleado dos métodos estadísticos diferentes, método FSM y longitud relativa de bandas (ver apartado 2.6 de material y métodos).

Longitud relativa de cromosomas y bandas

El análisis estadístico teniendo en cuenta la longitud relativa de los cromosomas, ha detectado, en el grupo E, existen 9 bandas cromosómicas con más roturas de lo que se esperaría por su longitud. En el grupo E y NE 9 y 8 bandas cromosómicas, respectivamente, tenían significativamente más roturas de lo que se esperaría por su longitud.

Grupo E

1q22, 6p11.2, 6p21.2, 9q13, 12p13.1, 17p11.2, 17q21, 18p11.2, 19p13.2.

Grupo NE

2q23, 6p21.2, 7q32, 9q13, 9q32, 14q24, 16q22, 16q23.

Las bandas cromosómicas, 6p21.2 y 9q13, estaban muy afectadas en los dos grupos

Método FSM

Según el programa estadístico FSM, para considerar a una banda cromosómica más sensible a la rotura (más frágil) tenía que presentar, al menos, 4 roturas. En el grupo E las bandas especialmente sensibles a la exposición al fuel han sido: 17q21 (8 roturas), 9q22

(5 roturas), 14q24 y 18p112 (4 roturas). En el grupo NE la banda más afectada por las roturas ha sido: 14q24 (4 roturas).

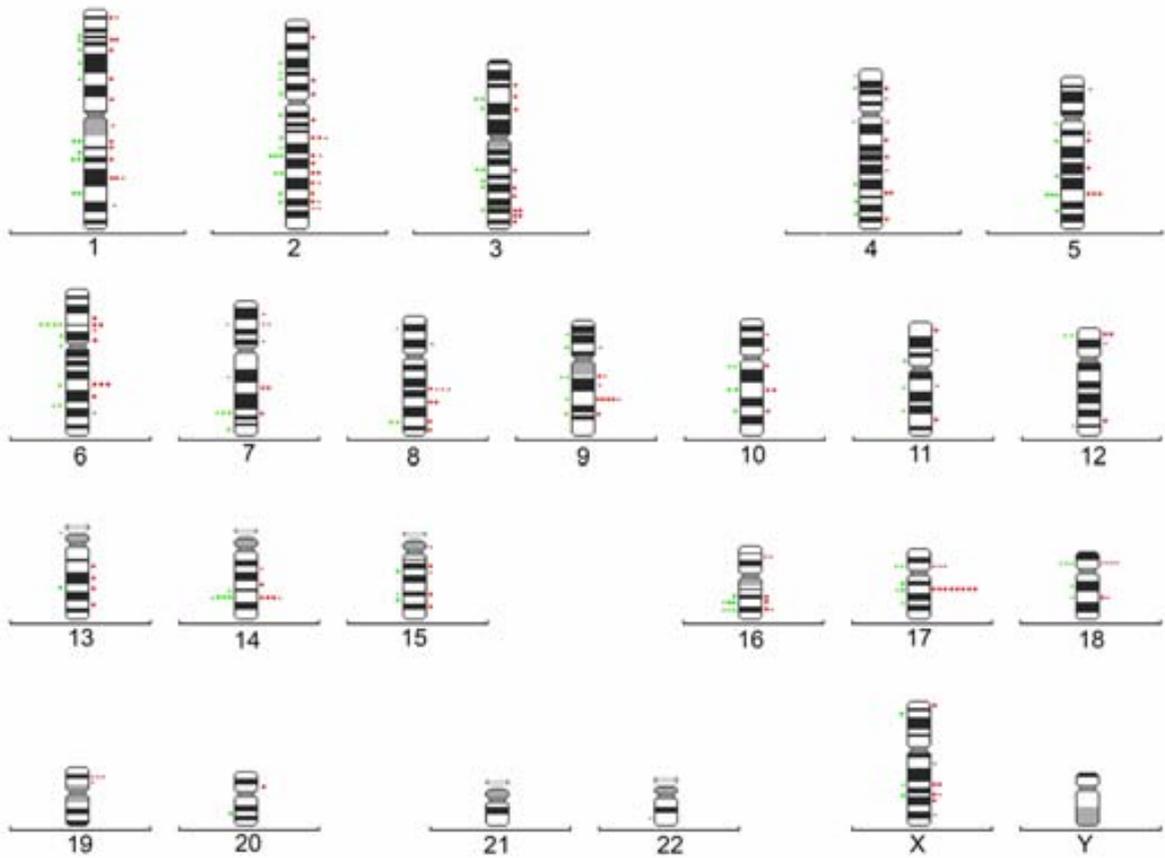


Figura 22. Ideograma mostrando la distribución de los puntos de rotura implicados en lesiones y alteraciones cromosómicas estructurales. Cada círculo indica un punto de rotura de una lesión cromosómica y cada triángulo un punto de rotura de una alteración estructural. A la izquierda, color verde, se muestran las roturas observadas en el grupo NE y a la derecha, color rojo, las del grupo E.

4.4. Resultados citogenéticos obtenidos en Prestige I y Prestige II

4.4.1. Estudio global de seguimiento

Las lesiones y alteraciones cromosómicas estructurales observadas en los grupos de E y NE en los dos estudios Prestige I y II se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Comparación global de lesiones y alteraciones cromosómicas estructurales obtenidas en los estudios Prestige I y II

	Prestige I			Prestige II		
	E (%)	NE (%)	p	E (%)	NE (%)	p
Nº individuos	91	46		52	44	
Lesiones cromosómicas	100/9520 (1,1)	35/4859 (0,7)	0,187	112/5346 (2,1)	112/4540 (2,5)	0,24
Roturas						
de cromátide	21/9520 (0,2)	9/4859 (0,2)		4/5346 (0,1)	6/4540 (0,1)	
de cromosoma	35/9520 (0,4)	7/4859 (0,1)		27/5346 (0,5)	16/4540 (0,4)	
Alteraciones estructurales	196/2448 (8,0)	33/1285 (2,6)	0,0001	98/1481 (6,6)	87/1260 (6,9)	0,82
Alteraciones estructurales. + roturas	818/9520 (8,6)	140/4859 (2,9)	0,0001	385/5346 (7,2)	335/4540 (7,4)	0,76

Lesiones cromosómicas

En ninguno de los dos estudios, Prestige II y Prestige I, se ha observado diferencias significativas entre la frecuencia de lesiones cromosómicas entre los grupos E y NE. En ambos estudios las roturas de cromosoma son más frecuentes que las de cromátide. En el estudio actual, Prestige II, el número de lesiones cromosómicas es mayor, tanto en el grupo E como en el de NE, que el detectado hace 4 años en el estudio Prestige I ($p=0,0001$).

Alteraciones cromosómicas estructurales

En la Figura 23 se comparan las alteraciones cromosómicas estructurales detectadas en los grupos E y NE del estudio Prestige I y Prestige II.

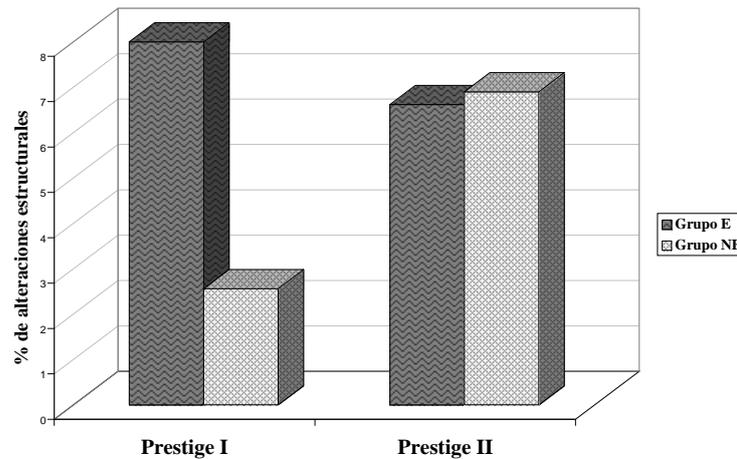


Figura 23. Alteraciones cromosómicas estructurales en los dos estudios, Prestige I y II

Las alteraciones cromosómicas estructurales en los individuos E seis años después de la exposición al fuel aún persisten, siendo su incidencia algo menor a la detectada previamente en el Prestige I ($p=0,12$). La frecuencia de alteraciones estructurales en el grupo NE ha sido mayor que la detectada en el Prestige I ($p=0.0001$).

Los tipos de alteraciones cromosómicas estructurales en los grupos E y NE obtenidas en el estudio del Prestige II vs Prestige I quedan reflejados en la Tabla 20.

En ambos grupos E y NE se observa que hay un predominio de alteraciones cromosómicas estructurales desequilibradas tanto en el Prestige I como Prestige II, siendo más frecuentes las deleciones y los cromosomas marcadores. Sin embargo a diferencia de lo que ocurría en el Prestige I, las alteraciones desequilibradas no muestran diferencias significativas entre el grupo E y NE ($p=0,78$).

Alteraciones cromosómicas numéricas

En la Tabla 21 quedan reflejadas las alteraciones cromosómicas numéricas en los estudios Prestige I y Prestige II.

La frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas en el estudio del Prestige II es menor a la observada en el Prestige I en ambos grupos E y NE. No observándose diferencias entre E y NE estadísticamente significativas ($p=0,09$).

Tabla 20. Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales en los estudios globales del prestigio I y Prestige II.

	Prestige I			Prestige II		
	E	NE	p	E	NE	p
N° de individuos	91	46		52	44	
Alteraciones estructurales %	196/2448	33/1285	0,0001	98/1481	87/1260	0,82
Equilibradas	12	7	0,8	2	1	0,66
translocaciones recíprocas	10	7		2	1	
translocación rob ¹	2	0		0	0	
Desequilibradas	184	26	0,0097	96	86	0,78
deleciones	23	6		35	28	
deleciones + ace ²	9	3		10	4	
fragm. aces	42	0		3	8	
translocación no equilibrada	23	3		8	3	
translocación dicéntrica	3	0		7	1	
translocación dic ³ + del ⁴ + ace		1		0	1	
translocación + del		0		0	2	
anillo	9	0		3	1	
marcadores	68	13		20	38	

¹rob=robertsoniana, ²ace=acéntrico, ³dic=dicéntrico, ⁴del=delección

Tabla 21. Frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas numéricas observada en Prestige I y Prestige II

	Prestige I			Prestige II		
	E (%)	NE (%)	p	E (%)	NE (%)	p
N° de individuos	91	46		52	44	
Metafases cariotipadas	2448	1285		1481	1260	
Metafases con alteraciones numéricas	437(17,9)	304 (23,7)	0,0001	203 (13,7)	201 (15,9)	0,11
Alteraciones numéricas	614 (25,1)	417 (32,5)	0,0001	231 (15,6)	228 (18,1)	0,09
Trisomías	67 (2,7)	48 (3,7)	0,11	34 (2,3)	29 (2,9)	0,99
Monosomías	547 (22,3)	369 (28,7)	0,0001	197 (13,3)	199 (15,8)	0,07

4.4.2. Estudio de seguimiento en los mismos individuos

Para conocer si las frecuencia de lesiones y de alteraciones estructurales observadas a los 2 años de la exposición al fuel (estudio Prestige I) se mantenían a los 6 años (estudio Prestige II) se han comparado los resultados obtenidos en los mismos individuos, excluyendo los 21 individuos NE añadidos en nuestro estudio. La Tabla 22 muestra los resultados citogenéticos del estudio de seguimiento Prestige II vs Prestige I.

Tabla 22. Resultados citogenético del estudio de seguimiento del Prestige II vs Prestige I

	Prestige I*			Prestige II*		
	E (%)	NE (%)	P	E (%)	NE (%)	p
Nº de individuos	52	23		52	23	
Lesiones	43/5392(0,8)	25/2443(1,0)	0,75	112/5346(2,1)	39/2365(1,6)	0,22
Rotura						
de cromátide	10/5392(0,2)	6/2443(0,3)		4/5346(0,1)	3/2365(0,1)	
de cromosoma	13/5392(0,2)	5/2443(0,2)		27/5346(0,5)	3/2363(0,1)	
Alteración estructural	125/1377(9,1)	13/624(2,1)	0,0001	98/1481(6,6)	34/652(5,2)	0,25
Alteración estructural + rotura	512/5392(9,5)	62/2443(2,5)	0,0001	385/5346(7,2)	129/2365(5,5)	0,005

* incluyen sólo los individuos en común en ambos estudios

Lesiones cromosómicas

En el estudio de seguimiento, igual que en el estudio global, la frecuencia de lesiones cromosómicas, tanto en los E como NE, era mayor que la detectada 4 años antes. Al analizar el tipo de lesión teniendo en cuenta sólo las roturas de cromátide y de cromosoma observamos que se producen más roturas de cromosoma en el grupo E, tanto en Prestige I como en Prestige II.

Alteraciones cromosómicas estructurales

La comparación de alteraciones cromosómicas estructurales detectadas en el estudio de seguimiento del estudio Prestige II vs Prestige I se muestra en la Figura 24.

Las alteraciones cromosómicas estructurales en el grupo E seis años después de la exposición al fuel aún persisten aunque su incidencia es menor a la detectada previamente en el Prestige I ($p=0,02$), no observándose diferencias significativas entre los grupos E y

NE ($p=0,25$). Sin embargo, en el grupo NE el número de alteraciones estructurales era mucho mayor al detectado en el Prestige I ($p=0,005$).

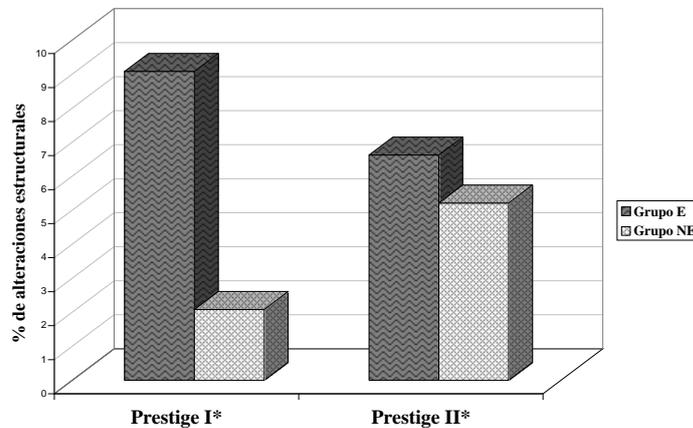


Figura 24. Alteraciones cromosómicas estructurales en Prestige I y II, incluyendo sólo los individuos comunes en ambas series.

Al agrupar las alteraciones cromosómicas estructurales y las lesiones provocadas por roturas (de cromátide y de cromosoma) el porcentaje de daño cromosómico claramente aumenta. Observando que en el Prestige II, los E presentan más daño vs. los NE ($p=0,005$).

Los tipos de alteraciones cromosómicas estructurales en los individuos E y NE obtenidas en el estudio de seguimiento (solo los mismos individuos) del Prestige I y Prestige II quedan reflejadas en la Tabla 23.

En ambos estudios, Prestige I y Prestige II, se observa un predominio de alteraciones cromosómicas estructurales desequilibradas en individuos E y NE, siendo las más frecuentes las deleciones, los fragmentos acéntricos, los cromosomas marcadores y las translocaciones. Sin embargo, a diferencia del Prestige I, en este estudio las diferencias de alteraciones desequilibradas entre E y NE, no son significativas ($p=0,30$).

Alteraciones cromosómicas numéricas

Las alteraciones cromosómicas numéricas en el estudio de seguimiento del Prestige II vs Prestige I pueden observarse en la Tabla 24. Las alteraciones cromosómicas numéricas seis años después de la exposición al fuel en los dos grupos de individuos fue menor a la detectada previamente en el Prestige I. La frecuencia de alteraciones es mayor en NE vs

E, siendo estas diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los dos estudios Prestige I y Prestige II.

Tabla 23. Tipo de alteraciones cromosómicas estructurales en Prestige I y II

	Prestige I*			Prestige II*		
	E (%)	NE (%)	p	E (%)	NE (%)	p
Nº de individuos	52	23		52	23	
Alteraciones estructurales	125/1377 (9,1)	13/624 (2,1)	0,0001	98/1481 (6,6)	34/652 (5,2)	0,25
Equilibradas	10	3	0,74	2	1	0,92
translocación recíproca	6	3		2	1	
translocación rob ¹	2	0		0	0	
Desequilibradas	115	9	0,0001	96	34	0,30
deleciones	15	4		35	12	
deleciones + ace ²	4	0		10	2	
acéntricos	31	0		3	6	
translocación no equilibrada	10	2		8	2	
translocación dicéntricas	3	0		7	1	
translocación dicéntrica + del ³ + ace	2	1		0	0	
translocación + del	0	0		0	1	
anillo	7	0		3	1	
marcadores	43	3		20	9	

* incluyen sólo los individuos en común en ambos estudios,

¹rob=robertsoniana; ²ace=acéntrico; ³del=delecion

Tabla 24. Alteraciones cromosómicas numéricas en Prestige I y II

	Prestige I*			Prestige II*		
	E (%)	NE(%)	p	E (%)	NE (%)	p
Nº de individuos	52	23		52	23	
Metafases cariotipadas	1377	624		1481	652	
Metafases con a. numéricas	258 (18,7)	142 (22,8)	0,043	203 (13,7)	116 (17,8)	0,018
Alteraciones numéricas	359 (26,1)	205 (32,8)	0,002	231 (15,6)	148 (22,7)	0,0001
Trisomías	49 (3,6)	24 (3,8)	0,036	34 (2,3)	20 (3,1)	0,37
Monosomías	310 (22,5)	181 (29,0)	0,002	197 (13,3)	128 (19,6)	0,0002

* incluyen sólo los individuos en común en ambos estudios

4.4.3. Asociación entre exposición al fuel y daño cromosómico en Prestige II vs Prestige I

La exposición al fuel y la presencia de lesiones y alteraciones cromosómicas observadas en el Prestige II y Prestige I por individuo se muestran en la Tabla 25 y 26.

Tabla 25. Asociación entre exposición al fuel y lesiones cromosómicas por individuo

	Prestige I			Prestige II		
	E (%)	NE (%)	OR (95% CI)	E (%)	NE (%)	OR (95% CI)
Individuos. sin lesión	42	26		10	8	
Individuo con lesión cromosómica						
Gaps	49(53,9)	20(43,5)	1,3 (0,8-2,0)	42 (80,8)	36 (81,8)	0,9 (0,7-1,2)
de cromátide	31(42,5)	15(36,6)	1,4 (0,8-2,4)	36 (78,3)	34 (81,0)	0,9 (0,6-1,2)
de cromosoma	27(39,1)	11(29,7)	1,5 (0,8-3,0)	34 (77,3)	31 (79,5)	0,9 (0,6-1,3)
Roturas	6(12,5)	5(16,1)	0,9 (0,3-3,1)	17 (63,0)	18 (69,2)	0,9 (0,5-1,6)
de cromátide	31(42,5)	13(33,3)	1,7 (0,9-3,1)	21 (67,7)	13 (61,9)	1,0 (0,6-1,8)
de cromosoma	17(28,8)	8(23,5)	1,5 (0,7-3,5)	4 (28,6)	6 (42,9)	0,7 (0,2-2,5)
	18(30)	7(21,2)	2,1 (0,9-5,0)	20 (66,7)	10 (55,6)	1,1 (0,6-2,1)

Tabla 26. Asociación entre exposición al fuel y alteraciones cromosómicas estructurales por individuo

	Prestige I			Prestige II		
	E (%)	NE (%)	OR (95% CI)	E (%)	NE (%)	OR (95% CI)
Individuos sin alteración estructural	27	25		15	11	1(ref)
Individuos con alteración estructural						
Alteraciones equilibradas	64(70,3)	21(45,7)	3,2(2,1-4,8)	37(71,2)	33(75,0)	0,8(0,6-1,1)
Alteraciones desequilibradas	11(29,0)	7(21,9)	2(0,8-5,1)	3(16,7)	1(8,3)	1,8(0,2-18,7)
deleciones	62(69,7)	17(40,5)	3,7(2,3-6,0)	36(70,6)	33(75,0)	0,8(0,6-1,1)
translocaciones	29(51,8)	8(24,2)	2,4(1,1-5,2)	28(65,1)	23(67,6)	0,9(0,6-1,4)
anillo	24(47,1)	4(13,8)	5,2(1,8-15,2)	9(37,5)	10(47,6)	0,9(0,4-2,1)
acéntricos	8 (22,9)	0(0,0)	11,2(1,7- Inf)	3(16,7)	1(8,3)	1,7(0,2-17,0)
marcadores	18(40,0)	0(0,0)	16,6(2,8- Inf)	12(44,4)	10(47,6)	0,8(0,3-1,8)
	30(52,6)	9(26,5)	3,3(1,6-7,1)	18(54,5)	19(63,3)	0,7(0,4-1,3)

Al contrario que en el Prestige I, en nuestro estudio de seguimiento no se ha detectado ninguna asociación entre exposición al fuel y presencia de lesiones cromosómicas, exceptuando las roturas de cromosoma. Únicamente, en Prestige II, se observa asociación con las alteraciones equilibradas y los anillos.

4.4.4. Cromosomas y bandas cromosómicas más afectadas en Prestige II y Prestige I

Los cromosomas, brazos cromosómicos y bandas más afectadas en los dos estudios se muestra en la Tabla 27. El cromosoma 17 y el brazo cromosómico 2q se han observado en el grupo E de ambos estudios. La banda 9q13 ha sido la única observada en Prestige I y Prestige II, al tener en cuenta la longitud relativa de bandas.

Tabla 27. Cromosomas, brazos cromosómicos y bandas más afectadas en Prestige I y II

	Prestige I		Prestige II	
	Grupo E	Grupo NE	Grupo E	Grupo NE
Crom. más afectados	3, 10, 17, 18	1, 8, 14	17	16, 2
Brazo corto	3p, 16p, 17p	1p, 6p, 8p	18p, 19p	5p, 18p,
Brazo largo	2q, 5q, 10q, 18q	1q, 3q, 7q, 8q, 14q	2q, 9q, 17q	2q, 16q
FSM	2q21, 3q27, 5q31		17q21 , 9q22, 14q24, 18p11.2	14q24
Longitud relativa de bandas	1p34.1, 2q21, 3q27, 4q33, 9q13 , 12q11, 13q11, 17p12, 18q11.2	9q31	1q22, 6p11.2, 6p21.2, 9q13 , 12p13.1, 17p11.2, 17q21 , 18p11.2 , 19p13.2	2q23, 6p21.2, 7q32, 9q13 , 9q32, 14q24, 16q22, 16q23

4.5. Individuos con cáncer

El estudio citogenético se ha llevado a cabo a partir de cultivos de linfocitos de 48 y 72 horas en 9 individuos, 7 con cáncer y 2 con tumores benignos. En el anexo 4 se detalla los resultados obtenidos en cada uno de los individuos.

4.5.1. Lesiones cromosómicas

Se han analizado 1765 metafases, de las que 939 proceden de cultivos de 48h y 826 de 72h (Tabla 28). Las frecuencias de lesiones cromosómicas observadas en ambos tipos de cultivos fueron similares ($p= 0,79$).

4.5.2 Alteraciones cromosómicas estructurales

Se han realizado 389 cariotipos, todos los individuos presentaban cariotipo normal (3 casos 46,XX y 6 casos 46, XY). Dado que un caso (individuo 4) presentaba valores muy altos de alteraciones estructurales (68 alteraciones en 29 células) no se tuvo en cuenta en la comparación global de resultados para no distorsionar los resultados. En la Tabla 29 se muestra la frecuencia y tipos de alteraciones cromosómicas estructurales en ambos cultivos de 8 individuos. En ambos tipos de cultivos predominaban las alteraciones desequilibradas (deleciones, fragmentos acéntricos y cromosomas marcadores).

La frecuencia de daño cromosómico por individuo detectado a partir de ambos cultivos queda reflejado en la Figura 25 observándose diferencias en la incidencia de lesiones y alteraciones estructurales según se analice un cultivo de 48h o de 72h.

Tabla 28. Frecuencia y tipo de lesiones cromosómicas detectadas en ambos grupos

	Cultivo 48h	Cultivo 72h	p
Nº de individuos	9	8	
Metafases analizados	939	826	
Metafases con lesiones (%)	20 (2,1)	20 (2,4)	0,80
Lesiones cromosómicas (%)	21 (2,2)	21 (2,5)	0,79
Gaps	13	11	0,92
de cromátide	9	7	
de cromosoma	4	4	
Roturas	8	10	0,48
de cromátide	4	4	
de cromosoma	4	6	

Tabla 29. Frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas estructurales en individuos con cáncer

	Cultivo 48h	Cultivo 72h	p
Nº de individuos	8	8	
Metafases cariotipadas	177	212	
Metafases con alteraciones estructurales (%)	8 (4,5)	9 (4,2)	0,88
Alteraciones estructurales (%)	9 (5,1)	17 (8,0)	0,34
Equilibradas	2	1	0,88
translocaciones recíprocas	2	1	0,88
Desequilibradas	7	16	0,20
deleciones	1	2	0,67
deleción + aceéntricos	0	1	0,36
fragmentos acéntricos	1	7	0,12
translocaciones no equilibradas	2	0	0,40
anillo	1	0	0,93
marcadores	2	6	0,41

4.5.3. Cromosomas y bandas cromosómicas

Mediante bandeado cromosómico se han identificado un total de 30 puntos de rotura en cultivo de 48h y 26 en cultivo de 72h excluyendo el individuo 4 por presentar un elevadísimo número de rotura (68 en 29 células). Todos los puntos de rotura detectados con tinción uniforme fueron localizados con bandas G. La distribución de los puntos de rotura en el ideograma humano se muestra en la Figura 26. Los cromosomas o brazos cromosómicos más afectados han sido: brazo 1q en cultivos de 48h y cromosoma 6 y brazo 16q en 72h.

Al analizar en cada individuo las bandas más afectadas, aunque el número de roturas es muy bajo, hemos detectado 3 bandas, 1q21,6q21,14q22, con dos roturas (Tabla 30).

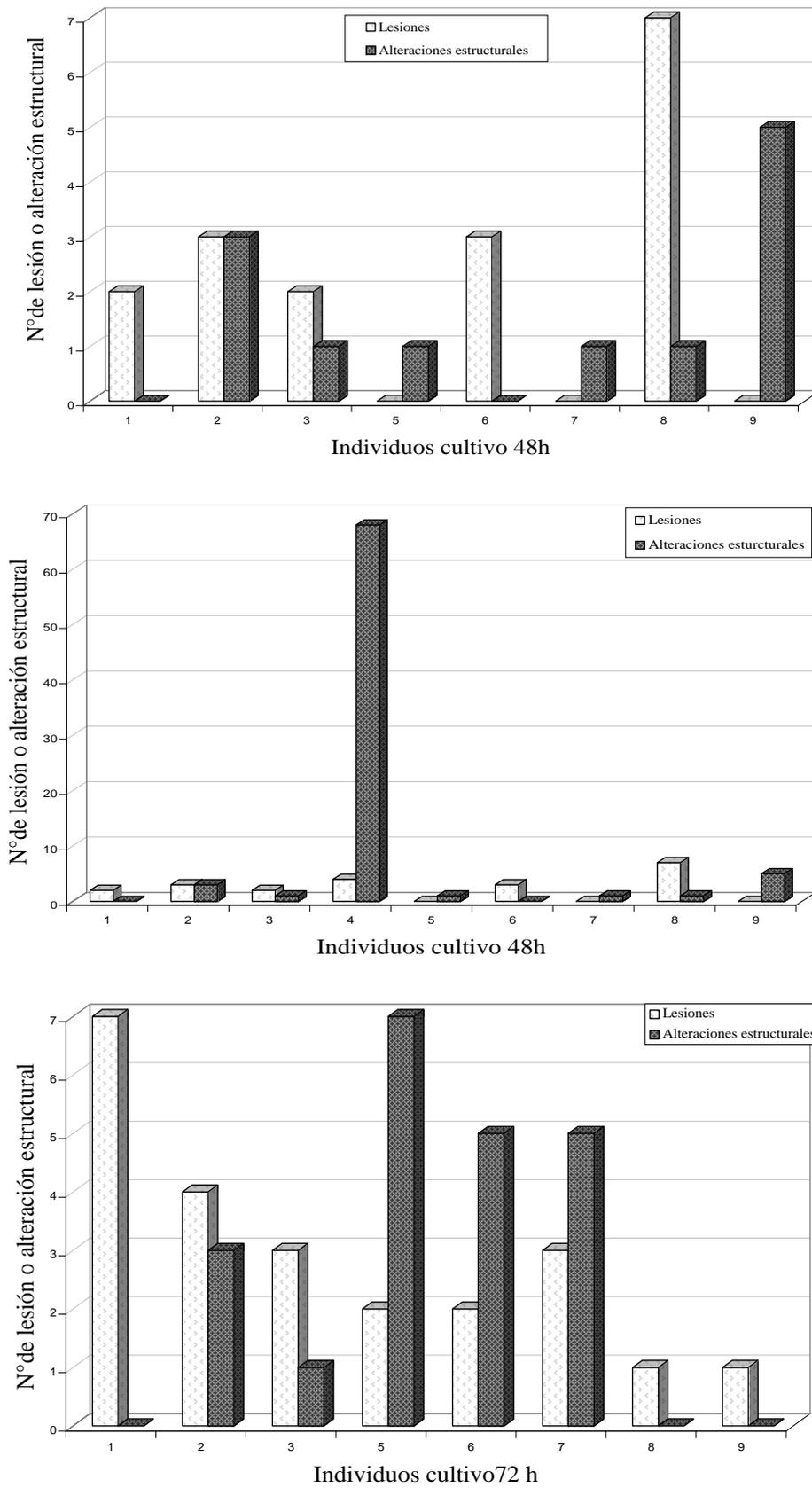


Figura 25. Lesiones y alteraciones cromosómicas estructurales por individuo. Arriba: Cultivo de 48h, sin incluir el individuo 4. Medio: Cultivo de 48h con todos los individuos. Abajo: Cultivo de 72h, sin incluir el individuo 4.

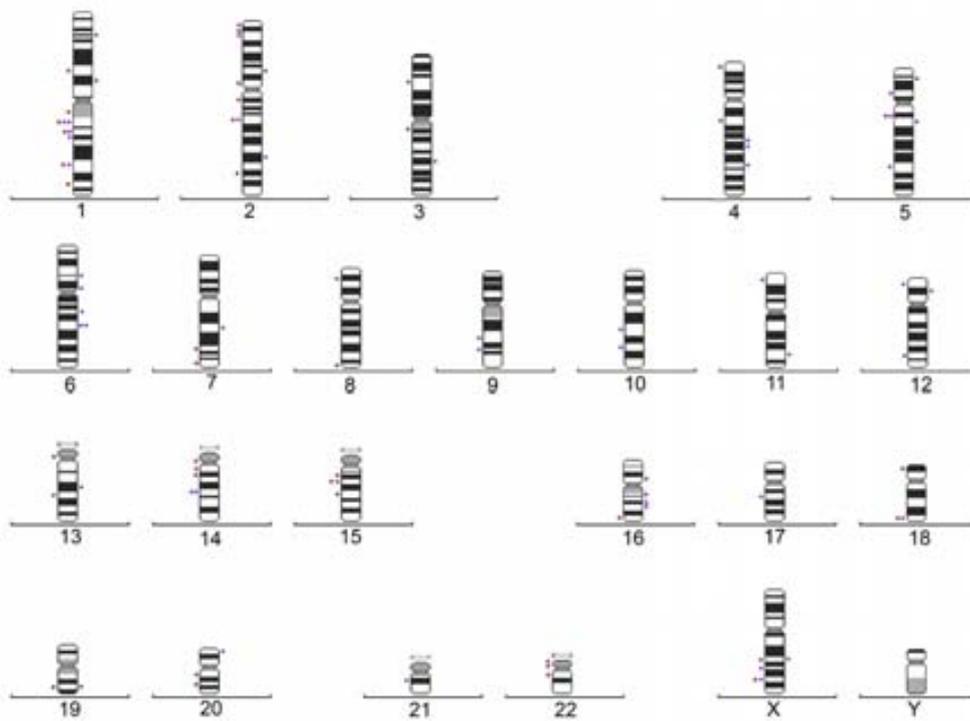


Figura 26. Ideograma con los puntos de rotura observados en los individuos con cáncer. A la derecha están marcados los puntos observado en los cultivos de 72h y a la izquierda los puntos de rotura observados en los cultivos de 42h. Los puntos de color rojo pertenecen al individuo 4.

Tabla 30. Bandas cromosómicas más afectadas en individuos con cáncer

Banda	Individuo		
	1	6	8
1q21	2(48h)	-	-
6q21	-	1(72h)	1(72h)
14q22	1(48h)	1(48h)	-

5. Discusión

5.1. Relevancia del estudio genotóxico de seguimiento Prestige II

El análisis realizado en este trabajo constituye un “estudio genotóxico de seguimiento” de pescadores que participaban en la limpieza del fuel vertido por el petrolero Prestige. Un estudio de seguimiento, de proyección o de incidencia, tiene como objetivo medir causalidad entre factores de riesgo y la enfermedad a estudiar. Pero ¿cuál fue la razón de llevar a cabo este estudio genotóxico de seguimiento? En el estudio genotóxico previo, Prestige I, realizado dos años después de la exposición al fuel, los individuos expuestos al fuel presentaban más alteraciones cromosómicas estructurales que los no expuestos (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, tesis doctoral, 2010). Estos resultados, además de inesperados por el tiempo transcurrido desde la exposición, fueron preocupantes debido a la asociación entre el incremento de alteraciones cromosómicas y un mayor riesgo a desarrollar cáncer (Bonassi *et al.*, 2000; Hagmar *et al.*, 2004; Bonassi *et al.*, 2008). La presencia de alteraciones cromosómicas 2 años después de la exposición al fuel sugería que algunos compuestos químicos, presentes en el fuel, podían permanecer en el cuerpo durante años. Otra posibilidad era que las células de la médula ósea hubieran sido afectadas, lo que implicaba una mayor predisposición a desarrollar algún tipo de neoplasia hematológica.

El interés científico y social derivado del estudio hizo que las autoridades sanitarias del FIS solicitaran al Grupo SEPAR-Prestige llevar a cabo un estudio de seguimiento para conocer si las alteraciones cromosómicas persistían o habían desaparecido, ya que las consecuencias clínicas derivadas podían ser graves. Pero, ¿cuál era el tiempo que debía transcurrir para realizar este estudio de seguimiento? La vida media de los linfocitos en sangre periférica se estima que es de cinco a siete años (Sprenst y Tough, 1994), así pues, si el estudio de seguimiento se realizara cuando la mayoría de los linfocitos se hubieran renovado, podríamos saber si las células de la médula ósea habían sido afectadas o no. Este estudio, Prestige II, se realizó 6 años después de la exposición y constituye, hasta el momento, el único estudio de seguimiento de una exposición aguda al fuel.

Otro aspecto relevante de ambos estudios, Prestige I y II, ha sido la aplicación de criterios estrictos de selección de individuos, gracias a la alta tasa de participación de pescadores en el estudio, una de las más altas descritas en estudios epidemiológicos. En el Prestige I se consiguió contactar con aproximadamente 10.000 pescadores pertenecientes a diferentes cofradías, de los que un 76% (6.780 individuos) (Zock *et al.*, 2007) contestaron satisfactoriamente los cuestionarios, elaborados específicamente para el estudio SEPAR-Prestige (Monyarch, tesis doctoral 2010). Esta alta tasa de colaboración hizo posible

establecer criterios de selección muy restrictivos, seleccionando sólo los individuos más expuestos (E) y los menos expuestos (NE). En el estudio genotóxico del Prestige I se seleccionaron un total de 137 individuos, es decir, un 1,37% de los individuos encuestados. En el estudio de seguimiento de genotoxicidad, Prestige II, la tasa de participación ha sido del 93% en el grupo E y 88% en el grupo NE (Zock *et al.*, 2012), siendo finalmente incluidos en el estudio genotóxico el 57% de los E y 50% de los NE. Aunque no existen estudios similares para comparar la tasa de participación, consideramos que ésta es muy alta, teniendo en cuenta que los individuos no recibían ningún tipo de compensación económica. Además, los pescadores, después de faenar en el mar, se dirigían a la Unidad Móvil donde se realizaban las pruebas funcionales y la obtención de muestras (horario de 17-24h). Hay que destacar el altruismo de estos pescadores que esperaban la llegada de la Unidad Móvil con lluvia, viento, nieve y mucho frío (noviembre a abril). El estudio genotóxico del Prestige II constituye el primer estudio de seguimiento de la exposición aguda al fuel puesto que el único estudio realizado un año después de la exposición aguda no analizaba los mismos individuos que en el primer estudio (Cole *et al.*, 1997).

Los estudios de genotoxicidad del Prestige I y II son, hasta el momento, los únicos que han analizado la exposición aguda al fuel en un elevado número de individuos muy seleccionados, a medio y largo plazo (2 y 6 años después de la exposición).

5.2. Características de la población estudiada en el Prestige II

En el estudio del Prestige I el número de individuos estudiados E y NE no fue equivalente (91E y 46NE) lo que obligó a ajustar los análisis estadísticos. En el estudio de seguimiento del Prestige II además de los 75 individuos anteriormente estudiados (52E y 23NE) se incluyeron 21 nuevos individuos NE que cumplían todos los criterios de selección, con el fin de obtener una distribución más equilibrada entre los dos grupos (52E vs 44NE). La Figura 27 muestra la distribución de los individuos E y NE estudiados en ambos estudios, Prestige I y II, y los individuos comunes a ambos estudios.

En el estudio del Prestige I los individuos E eran más jóvenes que los NE ($p=0,012$), (media de 49 años en E y de 53 años en NE). Al incluir nuevos individuos NE (Prestige II) las diferencias de edad se igualaron no observándose diferencias entre ambos grupos (53,6 años en el grupo E y 56,3 años en el grupo NE).

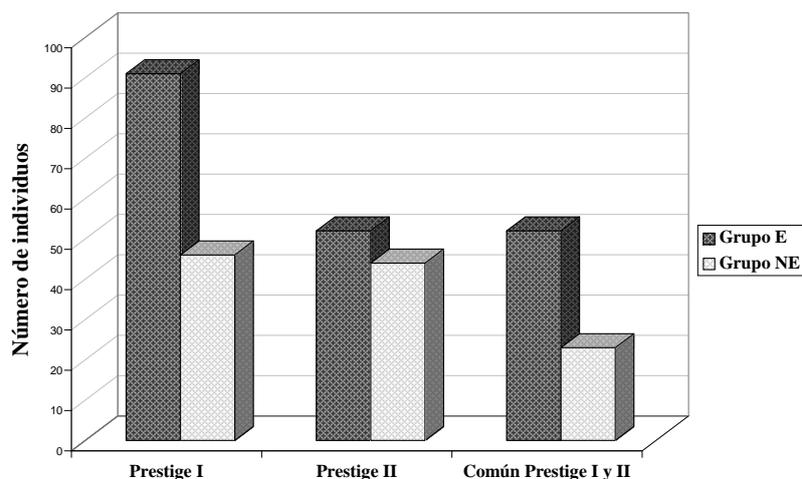


Figura 27. Distribución de individuos E y NE en los estudios Prestige I y II

La distribución de sexo también se igualó, con nuevos varones NE. En ambos estudios, Prestige I y II, participaron más mujeres que hombres (65,7% mujeres en Prestige I y 74 % Prestige II). En el presente proyecto, Prestige II, aunque no se observan diferencias ni en la edad ni en el sexo entre los grupos E y NE, un estudio más detallado ha revelado que los hombres eran más jóvenes que las mujeres en ambos grupos. Por este motivo en los análisis estadísticos los resultados citogenéticos se han ajustado los por edad y sexo.

Aunque la población general está expuesta a determinados agentes como el benceno (gasolina del coche, humo de los escapes de los automóviles, humo del tabaco, etc.) sólo se considera exposición crónica al fuel la que padecen los trabajadores de petroquímicas, refinerías, aviación y de determinados tipos de fabricas (zapatos, pinturas, de pavimentación, de maquetas etc.), entornos industriales y, por último, trabajadores de gasolineras y agentes de tráfico. Desde 1989, se han publicado 37 estudios genotóxicos de dicha exposición (revisado por Monyarch, 2010; Sellappa *et al.*, 2011; Diler y Çelik, 2011; Erdem *et al.*, 2012). En la mayoría de estos estudios el número de individuos expuestos analizados es variable y solo en nueve publicaciones se supera los 50 individuos (Tabla 31).

Tabla 31. Estudios genotóxicos de exposición crónica con más de 50 trabajadores expuestos

Autores	Tipo de trabajo	N° trabajadores	Biomarcador	Fumador
Pitarque <i>et al.</i> , 1996	Gasolineras	50E/43NE	MN/-	?
Tunca y Egeli, 1996	Fábrica de zapatos	58E/20NE	CA/+	Si/-
Surralles <i>et al.</i> , 1997	Petroquímicas	56E/28NE	MN/-	Si/-
Pitarque <i>et al.</i> , 2002	Fábrica de zapatos	52E/36NE	MN/+ SCE/-	Si/+
Carere <i>et al.</i> , 2002	Policías de tráfico	133E/57NE	SCE/- Cometa/-	Si/+
Kim <i>et al.</i> , 2004	Fábrica de Coca-Cola	178E/36NE	CA/+	Si/+
Garte <i>et al.</i> , 2005	Petroquímicas	158E/50NE	SSB/+	Si/-
Pandey <i>et al.</i> , 2008	Gasolineras	100E/100NE	Cometa/+ MN/+	Si/+
Diler <i>et al.</i> , 2011	Fábrica de maquetas	50E/50NE	MN/+	Si/+

Sólo en tres de estas 37 publicaciones se realizaron estudios de seguimiento a pesar de que, al tratarse de una exposición en el lugar de trabajo, es más fácil la colaboración de los afectados (Tompa *et al.*, 1994; Karacic *et al.*, 1995; Pitarque *et al.*, 2002).

Los individuos que participaron en las labores de limpieza del fuel vertido por el Prestige estuvieron sometidos a una exposición aguda al fuel. Este tipo de exposición sólo se produce en momentos puntuales y acostumbra a ser intensa, dando lugar a exposiciones durante días, semanas y, en algunos casos, incluso meses. A diferencia de la exposición crónica, no existen muchos estudios que analicen el daño genotóxico de individuos expuestos de forma aguda. En total, se han publicado 9 trabajos de los que 7 se han llevado a cabo en individuos expuestos al fuel vertido por el Prestige (Tabla 32).

El número de individuos expuestos estudiados es variable, oscilando de 10 a 180 con proporción similar de hombres y mujeres, excepto dos estudios (Clare *et al.*, 1984; Cole *et al.*, 1997) que incluyen sólo hombres. A excepción del estudio realizado por Clare *et al.* (1984), la edad de los participantes ha sido tomada en cuenta en el resto de estos trabajos. Los biomarcadores utilizados se resumen en la Tabla 32 observándose que solo un grupo (Clare *et al.*, 1984) utiliza, como nosotros, las alteraciones cromosómicas.

Tabla 32. Estudios genotóxicos realizados en individuos expuestos al fuel vertido por petroleros.

Petrolero	Autor, año	Nº individuos	Biomarcadores / resultados	Fumadores
Barco al puerto de Stanlow	Clare <i>et al.</i> , 1984	10 E/ 11 NE	SCE / + CA / -	?
Braer	Cole <i>et al.</i> , 1997	20 E/7 NE 20 E/4 NE	Aductos de DNA/ -	No
Prestige	Laffon <i>et al.</i> , 2006	34 E/ 35 NE	Ensayo Cometa/ + MN / -	Si
	Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2006	68 E/ 42 NE	SCE / + prolactina y cortisol Polimorfismos	Si
	Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2006	68 E/ 42 NE	Ensayo cometa/ + SCE / + MN / +	Si
	Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2008	179E	SCE / + Ensayo cometa/ + MN/ + prolactina y cortisol	Si
	Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2008	159 E/ 60 NE	MN / + Polimorfismos	Si
	Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2008	180 E/ 60 NE	Ensayo cometa/ + Prolactina y cortisol Polimorfismos	Si
	Rodríguez-Trigo <i>et al.</i> , 2010	91 E/ 46 NE	Lesiones crom./ - Alteraciones crom. / +	No
	Presente trabajo	52E/44 NE	Lesiones crom./ - Alteraciones crom. / -	No

5.3. Efecto genotóxico causado por exposición aguda al fuel

Todos los estudios genotóxicos de la exposición al fuel, incluido el presente estudio, se han llevado a cabo a partir de linfocitos procedentes de sangre periférica, debido a que los linfocitos son células que circulan por todo el cuerpo y, por tanto, están expuestos a los agentes tóxicos pudiendo mostrar el daño reciente de la exposición a dichos agentes. Sin embargo, a veces, los agentes químicos no siempre entran directamente a la sangre (pasan por el filtro “metabólico” del hígado), por lo que la piel constituye otro tipo de muestra

idónea para analizar el efecto de la exposición siempre que el agente tóxico sea absorbido por esta vía (García-Sagredo, 2008). A partir del daño genotóxico observado en linfocitos es difícil estimar el daño en otros tejidos/órganos. Así por ejemplo, si la exposición a un agente tóxico conduce a su inhalación, las células de los pulmones pueden estar más dañadas que los linfocitos y por lo tanto posiblemente se estaría infravalorando el daño en estas células si la analizamos en linfocitos. A pesar de las limitaciones de los estudios genotóxicos, se estima que el daño observado en linfocitos refleja relativamente bien los daños generados en otro tipo de célula (Hagmar *et al.*, 1994; Norpa *et al.*, 2006).

5.3.1. Prestige I y II versus otros estudios genotóxicos de exposición aguda al fuel

Diferentes estudios han mostrado la existencia de una asociación entre daño genotóxico y grado de exposición aguda al fuel utilizando para su análisis diferentes biomarcadores y distintos criterios de selección de participantes del estudio (Tabla 32). Entre los biomarcadores más utilizados están los SCE, los aductos de DNA, el ensayo cometa y los micronúcleos. Sólo un estudio (Clare *et al.*, 1984), aparte los del Prestige I y II, ha utilizado las alteraciones cromosómicas como biomarcador. A diferencia de nuestros resultados, estos autores no encuentran ninguna asociación entre grado de exposición y daño cromosómico, aunque sí detectan un incremento de SCE con el grado de exposición. Los SCE son muy sensibles a bajas dosis de exposición, pudiendo detectar daño genotóxico a dosis mucho más bajas que las que se requieren para producir alteraciones cromosómicas. Sin embargo, en los últimos años, el uso de los SCE como biomarcador ha ido disminuyendo ya que un aumento de SCE no se asocia a un mayor riesgo a padecer cáncer (Bonassi *et al.*, 2004; Suspiro y Prisa, 2011). El ensayo cometa es el que muestra más sensibilidad en la detección del daño del DNA recién producido, siendo un excelente biomarcador de exposición. Así, Laffon *et al.* (2006) y Perez-Cadahia *et al.* (2006 y 2008) encontraron un incremento de este biomarcador en los individuos mientras realizaban tareas de limpieza del fuel vertido por el petrolero. Sin embargo, el ensayo cometa no se considera un buen biomarcador de efecto para estimar el riesgo de padecer cáncer puesto que el daño detectado se repara fácilmente (Suspiro y Prista, 2011). Otro excelente biomarcador son los MN ya que se ha observado que altas tasas del mismo están asociadas a un mayor riesgo de padecer cáncer (Bonassi *et al.*, 2007). Se han descrito frecuencias elevadas de MN en síndromes de inestabilidad cromosómica que presentan un alto riesgo de padecer cáncer y en linfocitos de pacientes con varios tipos de tumor comparado a individuos sanos (Rosin y German, 1985; Duffaud *et al.*, 1997). Esta relación entre incremento de MN y riesgo de desarrollar cáncer llevó a Perez-

Cadahia *et al.* (2008) a analizar los MN en individuos expuestos al fuel, detectando niveles más altos de MN en los individuos muy expuestos. En el Prestige I realizamos el primer y único estudio, hasta el momento sobre la incidencia de MN dos años después de la exposición y no detectamos variaciones entre E y NE (Biern, 2010). Estos resultados sugieren que los MN no constituyen un excelente biomarcador para detectar efectos genotóxicos cuando el agente tóxico está ausente.

Otra diferencia entre los estudios de genotoxicidad del efecto agudo al fuel es el momento en que se obtuvo la muestra. En la mayoría de ellos, la muestra se obtuvo durante la exposición ó poco después (4 a 6 meses más tarde). En cambio, en los proyecto Prestige I y Prestige II habían transcurrido 2 y 6 años desde la exposición, siendo los dos únicos estudios de genotoxicidad a medio y largo plazo de exposición aguda al fuel. El daño cromosómico detectado, en el Prestige I y el Prestige II, contrasta con los resultados obtenidos por Cole *et al.* (1997) los cuales, utilizando aductos de DNA como biomarcador, no detectaban ningún efecto genotóxico un año después de la exposición al fuel. Estos resultados sugieren que la detección de alteraciones cromosómicas constituyen un biomarcador más idóneo para estudios genotóxicos a medio y largo plazo que los aductos de DNA.

En cuanto a los criterios de selección de los participantes, en nuestro estudio se han excluido totalmente los individuos fumadores, criterio no utilizado en ninguno de los otros trabajos, dada la clara evidencia existente entre consumo de tabaco e incremento de alteraciones cromosómicas (Littlefield y Joiner, 1986; Tawn y Whitehouse, 2001; Zhang *et al.*, 2002; de la Chica *et al.*, 2005; McHale *et al.*, 2008; Mateuca *et al.*, 2012). El daño genotóxico detectado en individuos expuestos si son fumadores podría estar mal valorado ya que el tabaco podría producir un enmascaramiento, efecto aditivo o potenciar el efecto genotóxico del fuel

Después de la catástrofe del Prestige, no se han publicado estudios genotoxicidad en ninguno de los 3 grandes vertidos de fuel, el petrolero Tasman Spirit de Pakistan (2003), el petrolero Hebei Spirit de Corea (2007), y el accidente de la plataforma petrolera del golfo de Méjico, Deepwater Horizon (2010) a pesar de su cercanía a las costas. En el diseño de los dos últimos accidentes para evaluar el efecto del fuel sobre la salud humana han participado miembros del grupo SEPAR-Prestige.

5.4. Comparación de resultados citogenéticos del Prestige I y II

Lo que diferencia los estudios realizados en el Prestige I y Prestige II con el resto son, sobre todo, tres aspectos: utilización de alteraciones cromosómicas como biomarcador, obtención de muestras sin estar presente el fuel (2 y 6 años después) y los criterios extremadamente rigurosos de selección de los individuos E y NE, descartándose todos los individuos que fumaban. El estudio de seguimiento del Prestige II tiene un diseño idéntico al del Prestige I (Rodríguez- Trigo *et al.*, 2010, Monyarch, 2010) efectuándose 4 años después.

5.4.1. Frecuencia y tipo de daño cromosómico: Estudio de seguimiento

La variabilidad individual es un factor importante a tener en cuenta en estudios genotóxicos ya que unos individuos pueden presentar un grado elevado de lesiones y alteraciones cromosómicas estructurales mientras otros no, independiente de si son individuos E o NE. Para minimizar la variabilidad individual en estos estudios es importante elegir un grupo relativamente homogéneo, por ejemplo realizar trabajos similares, lugar de residencia común, edad, sexo y hábitos de consumo (alcohol, tabaco, medicamentos etc.) similares. En nuestro estudio se ha tenido en cuenta estos factores de confusión ajustando los valores correspondientes al daño citogenético, por edad y sexo. Además, dada la clara evidencia existente entre consumo de tabaco e incremento de alteraciones cromosómicas (de la Chica *et al.*, 2005; Mateuca *et al.*, 2012) se han excluido los individuos fumadores, tanto en E como NE. La variabilidad genética también aporta una gran parte de la susceptibilidad individual complicando la interpretación de los valores observados. La susceptibilidad individual incluye polimorfismos en genes responsables de metabolismo o de reparación del DNA, pueden ser variabilidades en los genes de microRNAs, variaciones estructurales, tales como CNV o DS, diferentes patrones en la metilación del DNA o de histonas. Pérez-Cadahía *et al.* (2008) han estudiado los polimorfismos, tanto de genes responsables del metabolismo de enzimas xenebióticos como de genes responsables de la reparación del DNA, observaron que ciertos alelos de estos genes están asociados a un aumento de micronúcleos. En el presente estudio, dado que se ha observado la existencia de variabilidad interindividual en ambos grupos, E y NE, se han utilizado los valores citogenéticos como una media del grupo y no como valores individuales.

Otra valoración preliminar es que el daño cromosómico descrito en este estudio esté infravalorado ya que para conseguir un buen crecimiento celular se realizaron cultivo de 72h frente a los cultivos tradicionales de 48h utilizados en los estudios de genotoxicidad. Las alteraciones cromosómicas estructurales, sobre todo las desequilibradas, detectables en la

primera división (48h) podrían perderse en la siguiente división celular originando apoptosis y por tanto no se contabilizarían a las 72h (Sasiadek *et al.*, 1989).

Lesiones cromosómicas

En el estudio de seguimiento, al comparar las lesiones cromosómicas detectadas en los grupos E y NE (incluidos los 21 individuos nuevos) observamos que hay muchas más lesiones cromosómicas en ambos grupos que en el estudio del Prestige I pero no se observaban diferencias significativas entre E y NE.

Muchos autores analizan por separado las lesiones tipo cromosoma y tipo cromátide, excluyendo los gaps (Hagmar *et al.*, 2004; Rossner *et al.*, 2005; Bofetta *et al.*, 2006; Bonassi *et al.*, 2008). Según estos autores, los diferentes tipos de lesiones se inducen según los distintos mutágenos, así la radiación ionizante y los químicos radiomiméticos producen lesiones tipo cromosoma, mientras la mayoría de agentes químicos dan origen a lesiones tipo cromátide. La alta incidencia de roturas de cromosoma en E y NE, tanto en Prestige I como en Prestige II, sugiere que el daño producido por el fuel origina más lesiones tipo cromosoma. Es interesante destacar que en los artículos publicados por Rossner *et al.* (2005) y Bofetta *et al.* (2006), sugieren que el riesgo de padecer cáncer se relaciona fundamentalmente con lesiones tipo cromosoma.

Alteraciones cromosómicas estructurales

En los estudios genotóxicos es sumamente importante conocer la incidencia de alteraciones cromosómicas en la población ya que conocer los valores “normales” permite indicar si los valores en poblaciones expuestas a un agente toxico son altos o no. No obstante, todavía no se ha establecido cual es la incidencia “normal” en individuos sanos, pero se acepta que el porcentaje de células con alteraciones cromosómicas oscilaba en el rango de 0,35% a 3,1% (revisado por Monyarch, 2010). En un trabajo más reciente realizado por Suspiro y Prista (2011) este rango es algo mayor de 0,68% a 4,6 %, con un promedio de alteraciones del 2,1%.

Otro aspecto importante cuando se desea comparar los resultados con los obtenidos en otros estudios genotóxicos es el hecho que en la mayor parte de ellos en caso de utilizar como biomarcador las alteraciones cromosómicas se excluyen los gaps ya que analizan los cromosomas directamente con bandas G; es decir las alteraciones cromosómicas que se describen son una suma de alteraciones estructurales y de lesiones cromosómicas debidas a rotura (Hagmar *et al.*, 1994; Smerhovsky *et al.*, 2001; Rossner *et al.*, 2005; Bonassi *et al.*,

2008). En nuestro análisis citogenético se han incluido los gaps ya que hemos utilizado la tinción uniforme para la detección de ambos tipos de las lesiones (gaps y roturas) con el fin de no infravalorar el daño genotóxico producido por el fuel. En el Prestige II, al agrupar las alteraciones cromosómicas estructuras y las roturas no se observan diferencias entre E y NE, pero si se consideran solo los individuos NE previamente estudiados estas diferencias entre E y NE son significativas ($p=0,005$).

En el Prestige II la incidencia de alteraciones estructurales en los individuos E sigue siendo alta, aunque algo menor a la detectada previamente en el Prestige I, siendo en ambos casos superiores a la frecuencia que presenta la población. Estos resultados indican que el daño genotóxico debido a la exposición al fuel persiste 6 años después, lo que indica que el daño puede haber afectado a la médula ósea.

Un hallazgo inesperado ha sido la detección del aumento significativo de alteraciones estructurales en los NE del estudio del Prestige II siendo superior no solo al del grupo NE del Prestige I, sino también a los E del Prestige II. Las alteraciones cromosómicas estructurales observadas en individuos NE del Prestige I están dentro de la “normalidad” (2,08 %), pero en el estudio del Prestige II son frecuencias muy altas (7,39% en el estudio de seguimiento global y 5,47% al tener en cuenta sólo los individuos estudiados previamente). El análisis de los síntomas respiratorios y de los marcadores de estrés oxidativo de estos mismos individuos también han detectado un mayor daño en el grupo NE que en el E (Zock *et al.*, 2012).

Los individuos NE del Prestige I y los “nuevos NE” del Prestige II fueron seleccionados de cofradías con menor grado de exposición al fuel y que realizaban un trabajo similar, para minimizar los efectos de variabilidad entre diferentes poblaciones. Pero ¿Por qué en el estudio global del Prestige II los NE presentan más alteraciones estructurales que los E? ¿Se ha producido algún un sesgo a pesar que los criterios para incluir los “nuevos” NE siguen siendo los mismos? No podemos excluir un sesgo, sin embargo un examen detallado de las respuestas al cuestionario no nos han permitido descubrir ninguna posible causa ¿Puede haber otra explicación? El hecho de que las alteraciones cromosómicas estructurales en los individuos NE hayan aumentado durante los últimos cuadro años, hace pensar que estos individuos también han estado expuestos al fuel durante este tiempo, aunque haya sido una exposición más indirecta. Al ser pescadores es plausible asumir que su dieta sea rica en mariscos y pescados. Algunos de los compuestos químicos del fuel, como los HAPs, son resistentes a degradación en los océanos y se acumulan en organismos que habitan el fondo mar, como los mejillones (Haldorsson *et al.*, 2004; Perez-Cadahia *et al.*, 2004; Laffon *et al.*,

2006). Laffon y colaboradores (2006) examinaron la concentración de HAPs en mejillones en dos regiones diferentes de la costa de Galicia para examinar el grado de contaminación del mar. Los mejillones fueron recogidos entre medio año a un año y medio después del vertido del fuel del Prestige, detectando diferencias significativas en el daño del DNA (método de cometa) en los mejillones de zonas contaminadas comparado con los residentes en zonas no afectadas. Al ingerir estos organismos las sustancias tóxicas, aunque se encuentren en concentraciones bajas, se acumulan en los tejidos humanos pudiendo originar daños a largo plazo. Esta hipótesis estaría avalada por estudios en ratas alimentadas con mejillones contaminados de HAPs, las cuales presentaban un incremento de daño genotóxico (método de cometa) en células del hígado y, en menor grado, en células de la médula ósea, no observándose en linfocitos procedentes de sangre periférica (Lemiere *et al.*, 2005). Resultados similares se obtuvieron al analizar la expresión del gen CYP1A1 en el hígado de ratas después del consumo de mejillones contaminados por el fuel vertido por el buque *Erica* (Chaty *et al.*, 2008).

Nuestros resultados evidencian que aunque los criterios para seleccionar los “nuevos” participantes NE fueron idénticos a los empleados en el Prestige I se ha introducido un sesgo, poniendo de manifiesto la necesidad de establecer un buen diseño experimental en los estudios de seguimiento que sólo deben incluir los individuos previamente analizados. Si no hubiéramos comparado los datos de los “mismos” individuos (Prestige I), la interpretación de los resultados del Prestige II sería diferente, ya que se hubiera concluido que el daño genotóxico detectado previamente había desaparecido, al no observar diferencias entre E y NE.

En resumen, la presencia de alteraciones cromosómicas estructurales seis años después de la exposición sugiere que algunos compuestos químicos presentes en el fuel pueden permanecer en el cuerpo durante un periodo considerablemente largo, originando un efecto genotóxico continuo. El daño genotóxico observado puede pertenecer en una pequeña proporción a los linfocitos que se encontraban circulantes en el momento de la exposición al fuel y que aún no han muerto ya que la vida media de los linfocitos es de 5 a 6 años (Sprent y Tough, 1984). Es decir, la gran mayoría del daño genotóxico observado procedería de “nuevos” linfocitos y reflejaría que las células de la médula ósea habrían sido afectadas. Las consecuencias clínicas que se derivan de nuestros resultados son relevantes puesto que al estar afectadas las células de la médula ósea se incrementa el riesgo de padecer leucemias y linfomas, por lo que estos resultados deberían ser refrendados en un futuro.

Alteraciones cromosómicas numéricas

Se ha tenido en cuenta todas las alteraciones numéricas observadas en los cariotipos, con el fin de comprobar si la exposición al fuel podría haber inducido un incremento de pérdidas anafásicas o procesos de no-disyunción mitótica. En los dos grupos E y NE las trisomías y las monosomías han sido las alteraciones más frecuentes, siendo el número de trisomías similar entre ellos y el de monosomías más frecuente en el grupo NE. Comparado los resultados del Prestige II con los del Prestige I se observa un mayor número de alteraciones cromosómicas numéricas en el estudio anterior ($p=0,001$), principalmente por la mayor frecuencia de monosomías. Sin embargo, es conocido que parte de las monosomías pueden ser artefactuales, produciéndose durante la obtención de las extensiones cromosómicas.

5.4.2. Asociación entre grado de exposición al fuel y daño cromosómico

En los apartados anteriores hemos considerado los resultados citogenéticos como promedio de los valores observados en cada grupo de individuos. En el análisis entre grado de exposición al fuel y daño cromosómico se tiene en cuenta en cada participante, entre otros, el tipo de trabajo de limpieza realizado, las horas de exposición al fuel y las medidas de protección tomadas durante la recogida del fuel. En nuestro estudio hemos detectado un efecto dosis-respuesta para las rotura de cromosoma, las alteraciones estructurales equilibradas y los cromosomas en anillo, al igual que se observó en el Prestige I (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, 2010). La asociación entre daño genómico y exposición aguda al fuel también ha sido descrita con otros biomarcadores, tales como el ensayo cometa y los micronúcleos (Laffon *et al.*, 2006; Perez-Cadahia *et al.*, 2006; 2008b).

Estas observaciones muestran la necesidad de que las autoridades dispongan de un protocolo de actuación y de aplicación inmediata en trabajos de limpieza de vertidos accidentales de fuel. En este sentido, la publicación del grupo SEPAR- Prestige (Zock *et al.*, 2007) permitió que las autoridades de Corea del Sur y de Estados Unidos se pusieran en contacto con el grupo para minimizar los riesgos en las labores de limpieza de los vertidos ocurridos en sus países (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2008; Rodríguez-Trigo *et al.*, 2008).

5.4.3. Cromosomas y bandas más afectadas por la exposición aguda al fuel

Para determinar si hay cromosomas o regiones cromosómicas especialmente afectados por la exposición al fuel se han localizado, mediante las bandas G, 277 puntos de rotura implicados, tanto en las lesiones cromosómicas como las alteraciones estructurales. Nuestros resultados muestran que la distribución de los puntos de rotura no es uniforme a lo

largo del ideograma humano, evidenciándose que existen cromosomas y bandas especialmente afectadas. No obstante, teniendo en cuenta la enorme cantidad de DNA en los cromosomas y su compleja asociación con histonas es muy probable que muchos puntos de roturas no sean detectables al microscopio (Obe *et al.*, 2002). Por esa razón, no podemos asegurar que las bandas que nosotros hemos detectado como más afectadas, sean las únicas sensibles al fuel.

Cromosomas y brazos cromosómicos más afectados

En el Prestige II, los cromosomas y los brazos cromosómicos con mayor número de roturas varían según el grupo de individuos; en el grupo E destacan el cromosoma 17 y el 2q, 9q, 17q, 18p y 19p, mientras en el grupo NE los cromosomas 2, 16 y el 2q, 5p, 16q y 18p. En ambos estudios, Prestige I y Prestige II, se ha detectado que el cromosoma 17 y el brazo 17q son los más afectados en el grupo E mientras el 2q se ha observado en los dos grupos E y NE. En general los estudios genotóxicos que utilizan alteraciones cromosómicas, como biomarcador de exposición o biomarcador de riesgo a padecer cáncer, sólo cuantifican el daño, no especificando el daño por cromosomas, brazos cromosómicos o bandas cromosómica más afectados lo que imposibilita la comparación con nuestros resultados. Entre estos pocos estudios se encuentran los efectuados en individuos expuestos crónicamente al benceno, observándose que los cromosomas 2, 4 y 7 y los brazos cromosómicos 5q y 7q son los más afectados (Sasiadek *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1998a). Los resultados del Prestige II coinciden con los datos obtenidos por estos autores en cuanto al cromosoma 2 aunque en el estudio del Prestige I se ha detectado que 5q y 7q están también más implicados. Kim *et al.* (2004) estudiaron la presencia de alteraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a bajas dosis de benceno, detectando que la translocación entre el cromosoma 8 y 21 era ocho veces más frecuente que en controles. En nuestro análisis no hemos detectado esta translocación.

Bandas cromosómicas más afectadas

Para identificar de forma precisa las bandas cromosómicas más afectadas por la exposición al fuel se ha empleado dos métodos estadísticos diferentes, método FSM y longitud relativa de bandas. El método FSM asume que las 400 bandas del cariotipo tienen la misma posibilidad de rotura y el segundo método considera la longitud relativa de las bandas. La información derivada de ambos análisis es pues complementaria y por tanto tiene una mayor relevancia. Es interesante destacar que, dada la laboriosidad del análisis que requiere un

estudio secuencial uniforme-bandas G, no existen estudios genotóxicos en los que se describan la localización cromosómica de los puntos de rotura detectadas. Así pues, ninguno de los estudios realizados en individuos expuestos a dosis crónicas al benceno identifican la localización de los puntos de rotura implicados en las alteraciones cromosómicas (Zhang *et al.*, 1998, Stillman *et al.*, 2000; Holeckova *et al.*, 2004).

¿Existe alguna característica genómica en las bandas expresadas en el grupo E que las diferencia de las del grupo NE? Para poder responder a esta pregunta hemos analizado si las roturas cromosómicas observadas en E y NE coincidían con: el patrón de banda G claras/oscuras, lugares frágiles, regiones con duplicaciones segmentarias, secuencias CNV y genes microRNA utilizando diferentes bases de datos (<http://projects.tcag.ca/variation/> y <http://genome.ucsc.edu/>) (Tabla 33). Los datos detallados de cada banda están incluidos en el anexo 3.

Tabla 33. Bandas cromosómicas afectadas por roturas en el estudio de Prestige II

Coincidencia con	E	NE	Comunes a E y NE
Patrón de bandas G claras	56,1	56,4	76,1
Lugares frágiles (Mrasek <i>et al.</i> , 2010)	81,8	71,8	87,0
Lugares frágiles (HGM11, 1991)	30,3	25,6	52,2
Duplicaciones Segmentarias (DS)	75,8	84,6	80,4
Variación en número de copia (CNV)	98,5	97,4	100,0
microRNA	66,4	58,9	54,3
Bandas cromosómicas Prestige I	45,5	56,4	67,4

Las roturas cromosómicas tanto en E como NE afectan ligeramente más a las bandas G clara (más rica en genes transcripcionalmente activos). La acumulación de los puntos de rotura en bandas claras ha sido ampliamente descrita en la literatura (Barrios *et al.*, 1989; Fuster *et al.*, 1989; Martinez-Lopez y Tomaso, 2006) lo que indicaría que estas bandas son más sensible a sufrir roturas debido a su propia estructura molecular. El grado de coincidencia con la localización de lugares frágiles ha sido muy diferente según se utilizara la clasificación oficial de la ISCN o los descritos LF por Mraseck *et al.* (2010). El grado de coincidencia con LF según ISCN es mucho menor que los descritos por Mraseck *et al.* (2010) debido a que estos autores describen un mayor número de LF (ver Tabla 33). Una característica importante de los LF es que tienen un mayor número de clúster de secuencias de alta flexibilidad (Zlotorinski *et al.*, 2003) que puede afectar el control de la replicación del DNA

y la condensación de la cromatina haciendo estas regiones sean más sensibles a las roturas (Schwartz *et al.*, 2006). Un 75,8% de las bandas afectadas en E coinciden con regiones con duplicaciones segmentarias vs 84,6% de NE. Estos resultados confirmarían que las DS se asocian a la inestabilidad cromosómica descrita por otros autores (Shaw *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2005). La gran mayoría de las bandas con roturas en nuestro estudio son además ricas en secuencias CNV (98,5 % E y 97,4% NE). Por último las bandas en el grupo E se observa que coinciden en un 66,4% con genes microRNAs vs 58,9% en NE. Estos resultados confirmarían los datos descritos por otros autores en los que los genes que codifican para microRNAs están preferentemente localizados en bandas con LF (Calin *et al.*, 2004; Lagana *et al.*, 2010).

Nuestros resultados muestran que, en general, el efecto del fúel produce más del 50% de las roturas en regiones con un el patrón de banda G claras, lugares frágiles, regiones con duplicaciones segmentarias, secuencias CNV y genes microRNA. Sin embargo, el grado de coincidencia similar que se observa en el grupo NE sugiere que la exposición al fúel no produce roturas en regiones genómicas específicas. Por otra parte, los puntos de rotura detectados en Prestige I y Prestige II tienen un grado de coincidencia menor del 50% lo que indica que no hay un efecto apreciable atribuible al fúel. Se requieren más estudios similares al nuestro para confirmar esta observación.

Las bandas 17q21 y 18p11.2 están preferentemente afectadas por las roturas en el grupo E al utilizar ambos métodos estadísticos (FSM y longitud relativa de las bandas) sugiriendo que puede tratarse de regiones “muy” sensibles al fúel (ver Tabla 34). Por último, las otras 6 bandas que se encuentran entre las más afectadas solo en grupo E (1q22, 6p11.2, 12p13.1, 17p11.2, 19p13.2) pueden considerarse como “poco” sensibles al fúel.

¿Por qué las bandas 17q21 y 18p11.2 son “muy” sensibles al fúel? ¿Se localiza en ellas algún lugar frágil? ¿Se localiza en ellas algún gen que al quedar afectado por una rotura no reparada pudiera originar alguna disfunción celular encaminada a un descontrol en los mecanismos de proliferación o apoptosis y por ello incrementar la aparición de células cancerígenas?

La banda cromosómica 17q21, que es la más afectada por las roturas, corresponde a un patrón de banda G clara, que por sus características son ricas en secuencias AT y rica en genes y transcripcionalmente activa (Tabla 34). Por tanto al romperse tiene una mayor probabilidad de producir disrupción génica, provocar una pérdida de su función y como consecuencia se aumentaría la probabilidad de desarrollar cáncer. En esta misma banda se ha descrito recientemente un nuevo lugar frágil (FRA17D) (Mrasek *et al.*, 2010) y está

implicada en la inversión cromosómica polimórfica, presente en un 20% de la población europea (Stefansson *et al.*, 2005), es rica en duplicaciones segmentarias, en secuencias con CNV y contiene muchos genes que codifican microRNAs. En esta banda se localizan varios genes de los que el más conocido es el gen BRCA1, gen supresor de tumor, asociado a cáncer de mama y de ovario y que desempeña un papel crítico en la reparación de DNA, control del ciclo celular y el mantenimiento de integridad genómica (Wang *et al.*, 2009). Otros genes a destacar de esta región son: el gen HTLVVR que codifica para un receptor susceptible a infección por el virus oncogénico HTLV-1 y HTLV-2 (*Human T-cell leukemia virus type 1 and 2*) (Sommerfelt, 1988), el gen CDC27 que codifica para una de las subunidades del complejo promotor de la anafase y, por tanto, implicado en el control de proliferación celular (Jorgensen *et al.*, 2001), el gen RAD51C de reparación del DNA (Vaz *et al.*, 2010), el gen RAB5C que forman parte de la superfamilia de oncogenes Ras (Han *et al.*, 1996), el gen PHB que regula la proliferación celular al inhibir la síntesis de DNA (Sato *et al.*, 1993) y por último el gen CASC3 (*cancer susceptibility candidate 3*) (Tomasetto *et al.*, 1995)

Tabla 34. Características de las bandas más afectadas

Bandas más afectadas	Genes	LF	DS	CNV	micro RNA	Patrón banda clara
9q13 17q21	----- BRCA1, RAB5C,HTLVVR, CASC3, PHB CDC6, CDC27	FRA9J	si	si	no	banda clara
18p11.2	RAB12 ,RAB31	FRA17D no	si si	si si	si si	banda clara banda clara

Datos recogidos de : <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>; <http://projects.tcag.ca/variation/>.

La banda 18p11.2 es una de las 4 más afectadas por roturas en el grupo E, también corresponden a bandas G claras y es rica en genes (transcripcionalmente activos), rica en duplicaciones segmentarias, en secuencias CNV y que contiene genes microRNAs. Por el momento, no se ha descrito ningún lugar frágil en esta banda (ver Tabla 34). En esta banda se localizan los genes RAB12 y RAB31, de la familia de oncogenes RAS, cuyo papel

esencial es la transducción de señales y el control de la proliferación celular (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

A la vista de estos datos podemos decir que el fuel al originar roturas preferentemente en estas dos bandas podría conducir a una inestabilidad cromosómica general o a una disfunción génica que originarían un aumento del riesgo de desarrollar cáncer por exceso de proliferación o por fallo apoptótico.

Por último, la banda 9q13 una de las bandas especialmente sensible al fuel en el Prestige I (Monyarch 2010) ha sido detectada también en ambos grupos E y NE en nuestro estudio de seguimiento (ver Tabla 34). La presencia de esta banda en individuos NE no permite descartar que se trate de una banda sensible al fuel ya que los individuos NE pueden haber estado expuestos indirectamente al fuel aunque en mucho menor grado que los del grupo E. Se trata de una banda clara, ricas en DS y CNV y donde se localiza el LF (FRA9J) según Mraseck et al. (2010). No hemos detectado ningún gen implicado en control de proliferación reparación o apoptosis en la base de datos.

5.5. Consecuencias de la exposición al fuel: pacientes con cáncer

Nuestro estudio ha revelado que el daño cromosómico detectado previamente por nosotros, dos años después de la exposición al fuel vertido por el Prestige (Prestige I) permanece seis años después (Prestige II). Las implicaciones clínicas que el daño cromosómico puede tener a largo plazo son desconocidas. Sin embargo el trabajo de Bonassi *et al.* (2008) reveló la existencia de una clara asociación entre aumento de alteraciones cromosómicas en linfocitos y aumento del riesgo de padecer cáncer por lo que desde entonces se consideran que las alteraciones cromosómicas son un excelente biomarcador para estimar el riesgo a padecer cáncer. Además se conoce que cuando el daño cromosómico origina desequilibrios (como deleciones, acéntricos, cromosomas marcadores, cromosomas en anillo) puede conducir al desarrollo de cáncer (Frohling y Dohner, 2008). Todo ello hace pensar que los individuos que estuvieron muy expuestos al fuel durante las labores de limpieza y que 6 años después continúan presentando alteraciones cromosómicas tienen un elevado riesgo de padecer cáncer. Teniendo en cuenta que la vida media de los linfocitos es de 4-6 años, nuestros resultados sugieren que alguno de los componentes del fuel han afectado las células de la médula ósea pudiendo aumentar el riesgo de estos individuos a padecer neoplasias hematológicas. El hecho de que los individuos expuestos crónicamente al benceno tengan

un riesgo 20 veces mayor a desarrollar leucemias y linfomas que la población general (Zang *et al.*, 2002; Barregard *et al.*, 2009; Au *et al.*, 2010; Smith, 2010) apoyaría nuestra hipótesis. A pesar del enorme interés científico de conocer cuántos individuos de los casi 10.000 inicialmente encuestados en el estudio del Prestige I habían desarrollado cáncer, en el proyecto Prestige II se decidió estudiar solo aquellos individuos de los que teníamos datos de función respiratoria, biomarcadores de estrés oxidativo o de daño genotóxico. La razón básica para no estudiar la incidencia de cáncer en esta población fue económica ya que encarecía mucho el proyecto decidiéndose que se haría en una etapa posterior según los resultados que obtuviéramos en el estudio de seguimiento. Sin embargo, al repetir las encuestas a los mismos participantes del estudio anterior que acudían a la Unidad Móvil, 7 pescadores declararon padecer cáncer y 2 tener tumores benignos mientras que en el estudio anterior habían contestado negativamente a la pregunta ¿padece o ha padecido cáncer?. A excepción de uno, el resto pertenecían al grupo E y ninguno de ellos había sido estudiado a nivel genotóxico en el Prestige I. Después de una rápida deliberación se decidió estudiarlos en un grupo aparte del Prestige II siendo analizados a ciegas (sin saber si tenían cáncer, eran E o NE). De los 7 individuos diagnosticados con cáncer, 2 tenían cáncer de piel, 2 de próstata, 1 de colon, uno de vejiga y uno presentaba cáncer de útero y de mama. El hecho que el daño cromosómico detectado en linfocitos de sangre periférica es similar al daño en otros tejidos diferentes Norppa *et al.* (2006), explica que los individuos sometidos a la exposición aguda al fuel puedan desarrollar otros tipos de cáncer no hematológicos. Cuando una persona está expuesta a niveles altos de benceno se considera que alrededor de la mitad del benceno inhalado entra en el torrente sanguíneo y, una vez en la sangre, el benceno circula por el cuerpo y puede acumularse en la médula ósea (predisponiendo a leucemias) y en tejidos ricos en grasa.

La incidencia global de cáncer en España (Ferrelay *et al.*, 2006) se indica en la Tabla 35 comparada con la observada en nuestro estudio. La incidencia de cáncer en nuestra muestra del Prestige II (457 hombres y 221 mujeres) es más elevada a la descrita en la población general. Teniendo en cuenta todos los tipos de cáncer, la incidencia en nuestro estudio es del orden de 2 veces mayor en hombres y de casi 6 veces mayor en mujeres. Aunque para cada tipo de cáncer diagnosticado en nuestro estudio la incidencia también era mayor a la esperada (Datos recogidos de: Ministerio de sanidad y consumo, 2005; Fareley *et al.*, 2006; Garbe y Leiter, 2008), el número de individuos estudiados es muy bajo para llegar a algún tipo de conclusión.

Tabla 35. Incidencia de cáncer en España (por 100.000 individuos) vs la observada en nuestro estudio

	General	Hombre	Mujer	Prestige II	
				Hombre	Mujer
Todos los cánceres		417	236	875	1357
Piel	10-15			218	452
Próstata		77,2		438	
Colon		54,4	25,4	219	
Útero			24,5		452
Mama			93,6		452
Vejiga	44,6				452

(Datos recogidos de: Ministerio de sanidad y consumo, 2005; Fareley *et al.*, 2006; Garbe y Leiter, 2008)

Aún así, este hallazgo debe alertar a las autoridades sanitarias de la necesidad de hacer un seguimiento de los pescadores expuestos intensamente al fuel sin medidas de protección, con el fin de detectar etapas tempranas de cáncer.

¿Presentan estos individuos con cáncer mayor frecuencia de lesiones o alteraciones cromosómicas? La frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales (5,1 y 8,0 en cultivo de 46h y 72h) es mayor a la de la población (Suspiro y Prista, 2011), parecida a los valores de ambos grupos del Prestige II, y menor a la del grupo E del Prestige I. Las bandas cromosómicas con más roturas cromosómicas han sido: 1q21, 6q21, y 14q22 que coinciden con la localización de LF (FRA1F, FRA6F, FRA14F, respectivamente). Son bandas G claras, ricas en DS y secuencias CNV, y que codifican para microRNAs. En estas bandas se localizan genes que desempeña un papel importante en el control del ciclo celular, de la apoptosis y de la oncogénesis. En la banda 1q21 se encuentran genes que controlan la apoptosis, como el gen MCL1 (Mott *et al.*, 2007), el gen DAP3 (Kissil *et al.*, 1995) y el gen MLLT11, implicado en la leucemia mieloide aguda (Tse *et al.*, 1995). En la banda 6q21 se encuentra el oncogen SYN (Sembla *et al.*, 1986) y el gen CCNC implicado en la leucemia linfoblástica aguda (Li *et al.*, 1996). En la banda 14q22, se encuentra el gen CDKN3 regulador del ciclo celular (Hannon *et al.*, 1994) y contiene diferentes *loci* de susceptibilidad en individuos con cáncer de colón (Houlston *et al.*, 2008). Es importante destacar que el paciente con cáncer de colon no se observaron roturas en 14q22.

En resumen, nuestro estudio muestra que la gran mayoría de los individuos que desarrollaron cáncer en los 4 años que separan el estudio Prestige I y Prestige II pertenecían a personas que colaboraron en las labores de limpieza del fuel vertido por el petrolero. El hecho de que ningún individuo de este grupo presentase cáncer hematológico, como cabría esperar si la

médula ósea estuviera afectada, podría explicarse porque requiera más tiempo para su aparición.

Este estudio evidencia la necesidad de llevar a cabo exámenes clínicos detallados en los individuos que estuvieron intensamente expuestos al fuel con el fin de detectar etapas tempranas de cáncer. Por último, si bien estos resultados son “alarmantes” no se puede extrapolar a los casi 300.000 voluntarios que colaboraron de forma puntual en las labores de limpieza del fuel ya que nuestro estudio se ha realizado en un grupo de individuos muy seleccionados (muy expuestos) habiéndose seleccionado únicamente 1 de cada 1000 encuestados.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

1. Para establecer un buen diseño experimental en los estudios de seguimiento sólo se deben incluir los individuos previamente analizados en estudios anteriores.

2. El estudio genotóxico de seguimiento, analizando los mismos individuos que los del Prestige I, ha revelado que:

- La frecuencia de lesiones cromosómicas es similar en individuos expuestos y no expuestos en ambos estudios del Prestige I y Prestige II, indicando que no es buen biomarcador para analizar el efecto del fuel si este no está presente.

- La frecuencia y de alteraciones cromosómicas estructurales detectadas en individuos expuestos al fuel es superior a la detectada en la población y algo menor a la previamente observada en el estudio del Prestige I. Dada la corta vida media de los linfocitos, estos resultados indicarían que el daño genotóxico se observa en las nuevas generaciones de linfocitos y que las células de la médula ósea podría haber sido afectadas por la exposición al fuel.

- La alta frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales en individuos no expuestos, comparada con la del Prestige I, hace pensar que estos individuos han estado sometidos durante estos años a una exposición indirecta al fuel aunque de menor intensidad.

3. La distribución de los puntos de rotura implicados en lesiones y alteraciones cromosómicas en ambos estudios, Prestige I y Prestige II, no es homogénea a lo largo del genoma, presentando una tendencia a concentrarse en: bandas G claras (ricas en genes transcripcionalmente activos), lugares frágiles, regiones ricas en duplicaciones segmentarias y zonas con polimorfismos en el número de copias (CNV). Sin embargo, dado que el grado de coincidencia es similar en individuos expuestos y no expuestos no se puede atribuir al fuel las roturas en estas regiones genómicas.

4. En nuestro estudio, los individuos expuestos al fuel presentan un mayor número de roturas en las bandas 17q21 y 18p11.2 indicando que son regiones sensibles al fuel. Aunque no fueron observadas en el estudio anterior.

5. De los 7 individuos diagnosticados de cáncer, 6 habían estado expuestos al fuel, mostrando una incidencia de cáncer más elevada que la descrita en la población. La frecuencia de las alteraciones cromosómicas estructurales observadas en este grupo es similar a la observada en individuos expuestos en nuestro estudio. Estos datos muestran la necesidad de hacer un seguimiento de los individuos con un alto grado de exposición al fuel, con el fin de detectar el cáncer en etapas más tempranas.

6. Los estudios de genotoxicidad del Prestige I y II son, hasta el momento, los únicos que han analizado la exposición aguda al fuel a medio y largo plazo (2 y 6 años después de la exposición) en individuos seleccionados con criterios muy estrictos.

7. Bibliografía

- Abraham K S, Abdel-Gawad N B, Mahmoud A M, El-Gowaily M M, Emara A M, Hwaihy M M. 2011. Genotoxic effect of occupational exposure to cadmium. *Toxicol Ind Health*, 27(2):173-9.
- Aguilera F, Mendez J, Pasaro E, Laffon B. 2010. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *J Appl Toxicol*, 30: 291 - 301.
- Aksoy M. 1989. Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene. *Environ Health Perspect*, 82: 193 - 197.
- Albaiges J, Morales-Nin B, Vilas F. 2006. The Prestige oil spill: a scientific response. *Mar Pollut Bull*, 53: 205-207.
- Alkan C, Bradley P C, Eichler E E. 2011. Genome structural variation and genotyping. *Nature Reviews*, 12: 363-375.
- Alexandrov P N, Zhao Y, Pogue A, Tarr M A, Kruck T P, Percy M E, Cui J G, Lukiw W J, Arai Y, Ohgane J, Yagi S, Ito R, Iwasaki Y, et al. 2011. Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. *J Reprod Dev*, 57(4): 507-17.
- Arai J A, Feig L A. 2011. Long -lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. *Brain Res Bull*,85(1-2):30-35.
- Araújo A E O, Mezzomo B P, Ferrari I, Grisolia C K. 2010. Genotoxic effects caused by indoor exposure to petroleum derivatives in a fuel quality control laboratory. *Genetics and Molecular Research*, 9(2):1069-1073.
- Arlt M F, Durkin S G, Ragland RL, Glover T W. 2006. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA repair (amst)*, 5: 1126-1135.
- Arlt M F, Wilson T E, Glover T W. 2012. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22:1-7.
- Au W W, Giri A K, Ruchirawat M.. 2010. Challenge assay: A functional biomarker for exposure –induced DNA repair deficiency and for risk of cancer. *Int. H. Hyg. Environ. Health*, 213:32-39.
- Au W W. 2006. Heritable Susceptibility Factors for the Development of Cancer. *J.Radiat. Res*, 47: B13-B17.
- Au W W. 2006. Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *Int.J. Hyg. Environ.-Health*. 10: 1016-1024.
- Au W W y Salama S A. 2005. Use of biomarkers to Elucidate Genetic Susceptibility to Cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45:222-228.
- Bailey J A, Gu Z, Clark R A, et al. 2002. Recent segmental duplications in the human

- genome. *Science*, 297(5583):1003-7.
- Barregard L, Holmberg E, Stallsten G. 2009. Leukaemia incidence in people living close to an oil refinery. *Environmental Research*, 109: 985-990.
- Barrios L, Miro R, Caballin M R, Fuster C, Guedea F, Subias A, Egozcue J. 1989. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*, 41: 61 - 70.
- Biern G. 2010. Master en biologia cel.lular, citogenética i càncer. Estudio de Micrunucleos en individuos expuestos al fuel del petrolero Prestige.
- Bosch X. 2003. Prestige wreck. For Spain, oil spill disaster is in the bag. *Science*, 302:1485.
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control*, 8:444-472.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, et al. 2006. Chromosomal Aberrations and Cancer Risk: Results of a Cohort Study from Central Europe. *Am J Epidemiol*, 165: 36-43.
- Bonassi S, Abbondandolo L, Camurri L et al. 1995. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet*, 79: 133-135.
- Bonassi S, Hagmar L, Stombberg U, et al. 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently from exposure to carcinogens. *Cancer Res*, 60:1619-1625.
- Bonassi S, Lando C, Ceppi M, et al. 2004. No association between increased levels of high frequency sister chromatid exchange cells (HFCs) and the risk of cancer in healthy individuals. *Environ. Mol, Mutagen*. 43:134-136.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M et al. 2007. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.
- Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Stromberg U, Vermeulen R, Znaor A, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, et al. 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*. 29: 1178-1183.

- Brogger A, Hagmar L, Hansteen I L, Heim S, Hogstedt B, Knudsen K, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F. 1990. An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Genet Cytogenet*, 45(1):85-92.
- Burmeister M, McInnis M G, Zollner S. 2008. Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet*, 9:527-540.
- Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, et al. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *PNAS*. 9: 2999-3004.
- Carere A, Andreoli C, Galati R, Leopardi P, Marcon F, Rosati M V, Rossi S., Tomei F, Verdina A., Zijno A. *et al.* 2002. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat Res*, 518: 215 - 224
- Carrasco J M, Lope V, Perez - Gomez B, Aragonés N, Suarez B, Lopez - Abente G, Rodríguez - Artalejo F, Pollán M. 2006. Association between health information, use of protective devices and occurrence of acute health problems in the Prestige oil spill clean - up in Asturias and Cantabria (Spain): a cross - sectional study. *BMC Public Health*, 6: 1.
- Carrasco J M, Perez - Gomez B, Garcia - Mendizabal M.J, Lope V, Aragonés N, Forjaz M J, Guallar - Castillon P, Lopez - Abente G, Rodríguez - Artalejo F, Pollán M. 2007. Health - related quality of life and mental health in the medium - term aftermath of the Prestige oil spill in Galiza(Spain): a cross - sectional study. *BMC Public Health*. 7: 245.
- Chaty S, Rodius F, Lanhers M C. 2008. Induction of CYP1A1 in rat liver after ingestion of mussels contaminated by *Erika* fuel oils. *Arch Toxicol*, 82:75-80.
- Clare M.G, Yardley - Jones A, Maclean A C, Dean B J. 1984. Chromosome analysis from peripheral blood lymphocytes of workers after an acute exposure to benzene. *Br J Ind Med*, 41, 249 - 253.
- Cole J, Beare D M, Waugh A P, Capulas E, Aldridge K. E, Arlett CF, Green M H, Crum, J E, Cox D, Garner R C, *et al.* 1997. Biomonitoring of possible human exposure to environmental genotoxic chemicals: lessons from a study following the wreck of the oil tanker Braer. *Environ Mol Mutagen*, 30: 97 - 111.
- Cooper D, Bacola A, Férec C, Vasquez K, Kehrer-Sawatzki H, Chen J. 2011. On the Sequence-Directed Nature of Human Gene Mutation: The Role of Genomic

- Architecture and the Local DNA Sequence Environment in Mediating Gene Mutations Underlying Human Inherited Disease. *Human Mutation*, 32 (10): 1075-1099.
- Cooper G M, Nickerson D A, Eichler E E. 2007. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nature genetics supplement*, 39:22-29.
- de la Chica R A, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. 2005. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA*. 293: 1212 - 1222.
- CSIC (Centro Superior de Incestigaciones Científicas). 2003. Characterization of the spill and preliminary evolution in the environment. CSIC technical report No. 01; <http://csicprestigeiimcsices/desarro/informcsic/1/indexhtm>.
- Diler S B y Çelik A. 2011. Cytogenetic biomonitoring of carpet fabric workers using micronucleus frequency, nuclear changes and the calculation of riks assessment by repair Index. *DNA and Cell Biology*, 30(10): 821-827.
- Debatisse M, Le Tallec B, Letessier A, Dutrillaux B, Brison O. 2012. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics*, 28 (1) :22-32.
- Dillon L W, Burrow A A, Wang Y H. 2010. DNA instability at chromosomal fragile sites in cancer. *Current Genomics*. 11: 326-337.
- Duffaud F, Orsiere T, Cillani P, *et al.* 1997. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis*, 12:227-231.
- Durkin S G, Glover T W. 2007. Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* 41: 169-192.
- Erdem O, Sayal A, Eken A, Akay C, Aydin A. 2012. Evaluation of genotoxic and oxidative effects in workers exposed to jet propulsion fuel. *Int Arch Occup Environ Health*, 85:353-361.
- Ferelay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. 2006. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, 18(3):581-92.
- Finn K, Lowdnes N F, Grenon M. 2011. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell. Mol. Life Sci*, 69(9):1447-73.
- Frazer K A, Murray S S, Schork N J, Topol E J. 2009. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*, 10:241-251.
- Frohling S y Dohner H. 2008. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med*, 359:722 - 734.

- Fuster C, Miro R, Templado C, Barrios L, Moreno V, Egozcue J. 1989. Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements and in human sperm chromosomes. *Hum Genet*, 82: 330 - 334.
- Garbe C y Leiter U. 2008. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in dermatology*, 27(1):3-9.
- García-Lestón J, Roma-Torres J, Vilares M, Pinto R, Prista J, *et al.* 2012. Genetic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environment International*, 43:29-36.
- García-Sagredo J M. 2008. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochimica et Biophysica*, 1779: 363–375.
- Garte S, Popoc t, Georgieva T, Bolognesi C, Taioli E, Bertazzi P, Farmer P, Merlo D F. 2005. Biomarkers of exposure and effect in Bulgarian petrochemical workersexposed to benzene. *Chem Biol Interact*, 153 - 154: 247 - 251.
- Glover T W. 2006. Common fragile sites. *Cancer Letters*, 232:4-12.
- Goldstein B D, Osofsky H J, Lichtveld M Y. 2011. The Gulf Oil Spill. *N Engl J Med*, 364 (14): 1334-1347.
- Gonzaga-Jauregui C, Lupski J R, Gibbs R A. 2012. Human genome sequencing in Health and Disease. *Annu. Rev Med*, 63:35-61.
- Greenbaum I F, Fulton J K, White E D, Dahm P F. 1997. Minimum sample sizes for identifying chromosomal fragile sites from individuals: Monte Carlo estimation. *Hum Genet*, 101:109 - 112.
- Gu W, Zhang F, Lupski J R. 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics* 1(4):1-17.
- GuLF STUDY (pagina web); <http://nihgulfstudy.org/>.
- Ha M, Lee W J, Lee S, Cjepmg H K. 2008. A litterature review on health effects of exposure to oil spill. *J Prev Med Public Health*, 41:345-354.
- Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, *et al.* 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res*, 54(11): 2919-2922.
- Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, BroggerA, Knudsen L E, Norppa H, Reuterwall C. 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, 58: 4117-4121.

- Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S, Hansteen I L, Knudsen L E, Lindholm C, Norppa H. 2004. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res*, 64(6):2258-63.
- Haldórson H P, Ericsson G, Svavarsson J. 2004. DNA strand breakage in mussels (*Mytilus edulis* L) deployed in intertidal and subtidal zone in Reykiavik harbour. *Mar Environ. Res.* 54:471-4.
- Han H J, Sudo K, Inasawa J, Nakamura Y. 1996. Isolation and mapping of human gene (RABL) encoding a small GTP-binding protein homologous to the Ras-related RAB gene. *Cytogenet Cell Genet*, 73(1-2):137-9.
- Hannon G J, Casso D, Beach D. 1994. KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 91: 1731-1735.
- Hartwig A, Schwerdtle T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes : toxicological implications. *Toxicol. Lett*, 127:47-54.
- Hastings P, Ira G, Lupski J R.. 2009. A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *PLoS Genet*, 5(1): e1000327
- Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, Schrock E, Heiden T. 2006. Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Res*, 16:1222-1230.
- Helmrich A, Ballarino M, Tora L. 2011. Collisions between Replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular Cell*, 44: 966-977.
- HGM11. 1990. Oficial fragile sites.
- Holeckova B, Piesova E, Sivikova K, Dianovsky J. 2004. Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. *Ann Agric Environ Med*, 11:75 - 179.
- Houlston R S, Webb E, Broderick P, Pittman A M, Di Bernardo M C, Lubbe S, Chandler I, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Penegar S. 2008. Colorectal Cancer Association Study Consortium, Carvajal-Carmona, L., and 41 others. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nature Genet*, 40: 1426-1435.
- IARC. 1993. Cadmium and cadmium compounds. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Monogr. *Eval. Carcinog. Risks Hum*, 58: 119-237.

- Jiang Y, Lucas I, Young D J, Davis E M, Karrison T, Rest J S, Le Beau M M. 2009. Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. *Human Molecular Genetics*,18(23):4501-4512.
- Jorgensen P M, Graslund S, Betz R, Stahl S, Larsson C, Hoog C. 2001. Characterisation of the human APC1, the largest subunit of the anaphase-promoting complex. *Gene*, 262: 51-59.
- Karacic V, Skender L, Bosner - Cucancic B, Bogadi - Sare A. 1995. Possible genotoxicity in low level benzene exposure. *Am J Ind Med*, 27: 379 - 388.
- Khil P P, Camerini-Otero D. 2010. Genetic Crossovers are predicted accurately by the computed human recombination map. *PLoS Genet*, 6(1):1000831.
- Khelifi R, Hamza-Chaffai A. 2010. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 248(2):71-88.
- Kim S Y, Choi J K, Cho Y H, Chung E J, Paek D y Chung H W. 2004. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 14: 453 - 463.
- Kissil J L, Deiss L P, Bayewitch M, Raveh T, Khaspekov G, Kimchi A. 1995. Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J. Biol. Chem*, 270: 27932-27936.
- Laffon B, Rábade T, Pásaro E, Mendes J. 2006b. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician Coast. *Environment International*, 32:342-348.
- Laffon B, Fraga - Iriso R, Perez - Cadahia B, Mendez J. 2006a. Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil - contaminated birds. *Food Chem Toxicol*, 44: 1714 - 1723.
- Lagana A, Russo F, Sismeiro C, Giugno R, Pulvirenti A, Ferro A. 2010. Variability in the incidence of miRNAs and Genes in Fragile Sites and the Role of Repaeats and CpG Island in the Distribution of genetic material. *Plosone*, 5(6): e11166.
- Lemiere S, Cossu-Leguille C, Bispo A, Jourdain M-J, Lanhers M-C, Burnel D, *et al.* 2005. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the « Erica » oil –spill. *Mutat Res*, 581:11-21.
- Li H, Lahti J M, Valentine M, Saito M, Reed S I, Look A T, Kidd V J. 1996. Molecular cloning and chromosomal localization of the human cyclin C (CCNC)

- and cyclin E (CCNE) genes: deletion of the CCNE1 gene in human tumors. *Genomics*, 32: 253-259.
- Liou S H, Lung J C, Chen Y H, Yang T, Hsieh L L, Chen C J, Wu T N. 1999. Increased chromosome type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Research*, 59:1481-1484.
- Littlefield L G y Joiner EE. 1986. Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of long - term heavy smokers. *Mutat Res*, 170:145 - 150.
- Lukusa T, Fryns J P. 2008. Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 3-16.
- Marchetti F, Eskenazi B, Weldon R H, Li G, *et al.* 2012. Occupational Exposure to Benzene and Chromosomal Structural Aberrations in the Sperm of Chinese Men. *Environmental Health Perspectives*, 120(2): 229-234.
- Martinez- Lopez W y Di Tomaso M V. 2006 Chromatin remodelling and chromosome damage distribution. *HumExp Toxicol*, 25(9):539-45.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515-1531.
- Mateuca R A, Decordier I, Kirsch-Volders M. 2012. Cytogenetic methods in human biomonitoring: principles and uses. *Methods Mol Biol*, 817:305-34.
- Matullo G, Dunning A M, Guarrera S, *et al.* 2006. DNA repair polymorphism and cancer risk in non-smokers in a cohort study. *Carcinogenesis* 27:997-1007.
- McHale CM, Lan Q, Corso C, Li G, Zhang L, Vermeulen R, Curry J D, Shen M, Turakulov R., Higuchi R. *et al.* 2008. Chromosome translocations in workers exposed to benzene. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 74 - 77.
- McCarthy JF & LR Shugart (eds.). 1990. Biomarkers of environmental contamination, Lewis Publ., Boca Raton.
- Miller O J, Therman E. 2001. Human Chromosomes, fourth edition. Library of Congress Cataloging-in- Publication Data.
- Mishmar D, Rahat A, Scherer S W, Nyakatura G, Hinzmann B *et al.* 1998. Molecular characterization of common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:8141-8146.
- Monyarch G. 2010. Estudi genotòxic en limfòcits dels pescadors exposats al fuel abocat pel petroler Prestige. Tesis doctoral.

- Monyarch G, de Castro Reis F, Zock J-P, Pozo-Rodríguez F, Espinosa A, Giraldo J, Rodríguez-Trigo G, Castaño-Vinyals G, Gómez FP, Vereá H, Antó JM, Coll MD, Barberà JA, Fuster C. Errors in DNA repair and chromosomal bands particularly affected by oil detected in human lymphocytes two years after an acute exposure. *Mutat Research*, Submitted, mayo 2012.
- Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F., Gores, G. J. 2007. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, 26: 6133-6140.
- Mrasek K, Schoder C, Teichmann A C, Behr K, Franze B, Wilhelm K, Blaurock N, Claussen U, Liehr T, Weise A. 2010. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int. J. Oncol*, 36: 929-940.
- Norppa H, Bonassi S, Hansteen I L, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J. *et al.* 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*, 600: 37-45.
- Obe G, Pfeiffer P, Savage J R K, Johannes C, Goedecke W, *et al.* 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, 504: 17-36.
- Orjuela M A, Liu X, Warburton D, Siebert A L, Cujar C, Tang D, Jobanputra V, Perera F P. 2010. Prenatal PAH exposure is associated with chromosome-specific aberrations in cord blood. *Mutat Res*, 703(2):108-14.
- Pandey A K, Bajpayee M, Parmar D, Kumar R, Rastogi S k, *et al.* 2008. Multipronged evaluation of genotoxicity in Indian petrol-pump workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(9):695-707.
- Pavanello S, Clonfero E. 2000. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutation research*, 463:285-308.
- Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Mielzyńska D, Bolognesi C, Clonfero E. 2008. Micronuclei related to anti-B(a)PDE-DNA adduct in peripheral blood lymphocytes of heavily polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed non-smoking coce-oven workers and controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 27959.
- Perez-Cadahia B, Laffon B, Pásaro E, Méndez J. 2006. Genetic damage induced by accidental environmental pollutants. *ScientificWorldJournal*, 6:1221-37.
- Perez-Cadahia B, Lafuente A, Cabaleiro T, Pasaro E, Mendez J, Laffon B. 2007. Initial study on the effects of Prestige oil on human health. *Environ Int*, 33, 176-185.
- Perez-Cadahia B, Laffon B, Porta M, Lafuente A, Cabaleiro T, Lopez T, Caride A, Pumarega J, Romero A., Pasaro E, Méndez J. 2008a. Relationship between

- blood concentrations of heavy metals and cytogenetic and endocrine parameters among subjects involved in cleaning coastal areas affected by the 'Prestige' t tanker oil spill. *Chemosphere*, 71: 447-455.
- Perez-Cadahia B, Laffon B, Valdiglesias V, Pasaro E, Mendez J. 2008b. Cytogenetic effects induced by Prestige oil on human populations: the role of polymorphisms in genes involved in metabolism and DNA repair. *Mutation Res*, 653 :117-123.
- Perez-Cadahía B, Méndez J, Pásaro E, Lafuente A, Cabaleiro T, Laffon B. 2008c. Biomonitoring of Human Exposure to Prestige Oil: Effects on DNA and Endocrine Parameters. *Environmental Health Insights*, 2:83-92.
- Pitarque M, Carbonell E, Lapeña N, Marsa M, Torres M, Creus A, Xamena N, Marcos R. 1996. No increase in micronuclei frequency in cultured blood lymphocytes from a group of filling station attendants. *Mutat Res*, 367(3):161-7.
- Pitarque M., Vaglenov A, Nosko M, Pavlova S, Petkova V, Hirvonen A, Creus A, Norppa H, Marcos R. 2002 Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environ Health Perspect*, 110: 399 - 404.
- Pollack A, Hanlon A, Horwitz E, Feigenberg S, Konski A, Movsas B, Greenberg R, Uzzo R, Ma Ch, McNeeley S, Buyyounouski M, Price R. 2006. Dosimetry and preliminary acute toxicity in the first 100 men treated for prostate cancer on a randomized hypofractionation dose escalation trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64(2): 518–526.
- Pozo Rodriquez F y SEPAR-Prestige. 2008. Contingency plan. International Symposium in Commemoration of the 1st Anniversary of Hebei Spirit Accident oil Spill and Health Seoul, Ponencia.
- Puliti A, Rizzato C, Conti V, Bedini A, Gimelli G, Barale R, Sbrana I. 2010. Low copy repeats on chromosome 22q11.2 show replication timing switches DNA flexibility peaks and stress inducible asynchrony, sharing instability features with fragile sites. *Mutation Research*, 686:74-83.
- Rodriguez-Trigo G, Zock J P, Isidro Montes I. 2007. Health effects of exposure to oil Spills. *Arch Bronconeumo*, 43: 628-635.
- Rodriguez-Trigo G y Separ Prestige. 2008. Prestige oil spill and health effect. International Symposium in Commemoration of the 1st Anniversary of Hebei Spirit Accident oil Spill ad Health Seoul, Ponencia.

- Rodriguez F, Gomez F P, Monyarch G, Bouso L, Coll M D, Vereá H, Anto J M, Fu ster C, *et al.* 2010. Health Changes in Fishermen 2 Years After Clean - up of the Prestige Oil Spill. *Ann Intern Med.*
- Rosin M P, German J. 1985. Evidence for chromosomal instability in vivo in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. *Hum. Genet,* 71:187-191.
- Rossi A M, Hansteen I L, Skjelbred C F, Ballardín M, *et al.* 2009. Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1. *Environ. Health Persp,* 117(2):203-208.
- Rossner P, Bofetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovský Z, Landa K, Juzová D, Srám R J. 2005. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes of Healthy Subjects and Risk of Cancer. *Environ. Health Persp,* 113(5):517-520.
- Saarikoskim S T, Vohó A, Reinikainen M, Anttila S, *et al.* 1998. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Int. J. Cancer,* 77:516-521.
- Sabucedo J M, Arce C, Senra C, Seoane G, Vázquez I. 2009. Symptomatic profile and health related quality of life of persons affected by the Prestige catastrophe. *Disasters.*
- Sasiadek M, Jagielski J, Smolik R. 1989. Localization of breakpoints in the karyotype of workers professionally exposed to benzene. *Mutat Res,* 224:235 - 240.
- Sasiadek M. 1992. Nonrandom distribution of breakpoints in the karyotypes of workers occupationally exposed to benzene. *Environ. Health Perspectives,* 97:255-257.
- Sato T, Sakamoto T, Takita K, Saito H, Okui K, Nakamura Y. 1993. The human prohibitin (PHB) gene family and its somatic mutations in human tumors. *Genomics,* 17(3):762-764.
- Schinzel A y Schmid W. 1976. Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy. *Mutat Res,* 40: 139-166.
- Schmidt CW. 2011. Study to examine health effects in Deepwater Horizon oil spill cleanup workers. *Environ Health Perspect.,* 119(5): A204. Semba K, Nishizawa M, Miyajima N, Yoshida M C, Sukegawa J, Yamanashi Y, Sasaki M, Yamamoto T, Toyoshima K. 1986. Yes-related protooncogene, *syn*, belongs to the protein-tyrosine kinase family. *Proc. Nat. Acad. Sci,* 83: 5459-5463.

- Schwartz M, Zlotorynski E, Kerem B. 2006. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters*,232: 13-26
- Sellappa S, Mani B, Keyan K S. 2011. Cytogenetic biomonitoring of road paving workers occupationally exposed to PAHs. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(3)713-717.
- Sharp A J, Locke D P, McGrath S D, Cheng Z, Bailey J A, Vallente R U, Pertz L M, Clarc R A, Schwarts S, Segraves R, Oseroff V V, Albertson D G, Pinkel D, Eichler E E. 2005. Segmental Duplication and Copy Number Variation in the Human Genome. *Am.J. Hum. Gen.*, 77:78-88.
- Shaw C, Bi W, Lupski R. 2002. Genetic Proof of Unequal Meiotic crossovers in reciprocal deletion and duplication of 17p11.2. *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 1072-1081.
- Smerhovsky Z, Landa K, Rössner P, Brabec M, *et al.* 2001. Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environ Health Perspec.*, 106(4): 937-946.
- Smith M T. 2010. Advances in Understanding Benzene Health Effects and Susceptibility. *Annu. Rev. Public Health*,31:133-148.
- Sommerfelt M A, Williams B P, Clapham P R, Solomon E, Goodfellow P N, Weiss R A. 1988. Human T cell leukemia viruses use a receptor determined by human chromosome 17. *Science*, 242: 1557-1559.
- Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, *et al.* 2005. A common inversion under selection in Europeans. *Nature Genetics*, 37: 129 – 137.
- Stillman W.S, Varella - Garcia M, Irons R D. 2000. The benzene metabolite, hydroquinone, selectively induces 5q31 - and - 7 in human CD34+CD19 - bone marrow cells. *Exp Hematol*, 28:169 - 176.
- Suarez B, Lope V, Perez - Gomez B, Aragonés N, Rodríguez - Artalejo F, Marques F, Guzman A, Vilorio L J, Carrasco J M, *et al.* 2005. Acute health problems among subjects involved in the cleanup operation following the Prestige oil spill in Asturias and Cantabria (Spain). *Environ Res*, 99: 413 - 424.
- Surrallés J, Autio K, Nylund L, Jarventaus H, Norppa H, Veidebaum T, Sorsa M, Peltonen K. 1997. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene - exposed workers. *Carcinogenesis*, 18: 817 - 823.
- Suspiro A, Prista J. 2011. Biomarkers of occupational exposure to anticancer agents: A minireview. *Toxicology Letters* ,207; 42-52.

- Sutherland G.R. 1979. Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. *Am Hum Genet*, 31, 136 - 148.
- Sutherland G.R, Richards R.I. 1999. Fragile sites - cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am J Hum Genet*, 64: 354 - 359.
- Tawn E J y Whitehouse C A. 2001. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *Mutat Res*, 490: 171 - 177.
- Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei M G, Chenard M P, Lidereau R, Basset P, Rio M C. 1995. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* , 28: 367-376.
- Tompa A, Major J, Jakab M G. 1994. Monitoring of benzene - exposed workers for genotoxic effects of benzene: improved - working - condition - related decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res*, 304, 159 - 165.
- Tse W, Zhu W, Chen H S, Cohen A. 1995. A novel gene, AF1q, fused to MLL in t(1;11)(q21;q23), is specifically expressed in leukemic and immature hematopoietic cells. *Blood*, 85: 650-656.
- Tunca B T. y Egeli U. 1996. Cytogenetic findings on shoe workers exposed long term to benzene. *Environ Health Perspect*, 104(6): 1313 - 1317.
- Vaz F, Hanenberg H, Scuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, *et al.* 2010. Mutation of the RAD51C gene in Fanconi anemia like disorder. *Nature Genetics*, 42(5):406-411.
- Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*, 533:107-20.
- Wahls W P, Davidson M K. 2011. DNA-sequence-mediated, evolutionarily rapid redistribution of meiotic recombination hotspots. *Genetics*, 189(3):685-94.
- Wang B, Hurov K, Hofmann K, Elledge S J. 2009. NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes Dev*, 23: 729-739.
- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes R B, Li G, *et al.* 1998a. Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene. *Carcinogenesis*, 19:1955-1961.
- Zhang L, Eastmond DA, Smith MT. 2002. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Critical Reviews in Toxicology*, 32(1) 1-42.

- Zhang L, Lan Q, Guo W, Hubbard A E, et al. 2011. Chromosome-wide Aneuploidy study leukemogen, benzene. *Carcinogenesis*, 32(4): 605-612.
- Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J Bem-Porat N, Ozeri E, et al. 2003. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Molecular and cellular biology*, 23(20): 7143-7151.
- Zock J P, Rodriguez-Trigo G, Pozo Rodriguez F, Barbera J A, Bouso L. TorralbaY, Anto J M, Gómez Z P, Fuster C, Verera H. 2007. Prolonged respiratory symptoms in clean –up workers of the prestige oil spill. *Am J Respir Crit Care Med*, 176:610-616.
- Zock J P, Rodríguez-Trigo G, Rodríguez-Rodríguez E, Espinosa A, Pozo-Rodríguez F, Gómez F, Fuster C, Castaño-Vinyals G, Antó J M, Barberà J A. 2012. Persistent respiratory symptoms in clean-up workers 5 years after the Prestige oil spill. *Occup Environ Med*,(Apr 26)
- Zock JP, Rodríguez-Trigo G, Rodríguez-Rodríguez E, Souto-Alonso A, Espinosa A, Pozo-Rodríguez F, Gómez FP, Fuster C, Castaño-Vinyals G, Antó JM, Barberà JA. Evaluation of the persistence of functional and biological respiratory health effects in clean-up workers 6 years after the *Prestige* oil spill, En preparación, mayo 2012
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acid Res*, 32:3406-3415.

8. *Anexos*

Anexo 1. Resultados cytogeneticos en los 52 individuos E										
Expuestos	Cariotipo	N° de metafases analizadas	N° de metafases con lesión	N° total de lesión	Tipo de lesión cromosómica (gaps y breaks)	N° de metafases cariotipadas	N° de metafases con alteración estructural	N° de alteraciones estructurales	Tipo de alteración estructural	Alteraciones numéricas
E1	46,XX	102	1	1	chtg(2q33)	25	2	3	del18p11.2, mar - del(xq13)	-12;-7;-22;-16;-X;-X;-22
E2	46,XX	100	1	1	chsb(Xq22)	26	3	3	der(16)t(16;?) - del(16p13.1) - mar	-5;-16;-X;-14,-22;-14
E3	46,XX	101	2	2	chtg(12p13.1);chtg(11p15)	27	0	0		-19
E4	46,XX	101	4	6	chsb(Xp22.3),chtg(14q22);chtg(2q32),chtg(9q32);chsg(17q21);chsb(xq22)	25	1	2	del(7p15)+mar	
E5	46,XX	101	3	3	chsg(6q21);chtg(5q31);chtg(7q22)	25	0	0		-X;-21,-11,-12,-19
E6	46,XX	102	2	1	chtg(2q21)	30	1	1	anillo de 17	-3;-X,-18;-21
E7	46,XX	105	6	6	chtg(3p21);chtg(2q31);chtg(10q24);chsb(9q13);chsg(10q22);chsg(6p21.2)	28	4	8	r(16) - der(17?) - del(18p1.12) - mar1,mar2,mar3,mar4,mar5	-19;-8,-10
E8	46,XX	103	0	0		27	0	0		-X;-15
E9	46,XX	105	6	6	chtg(3q24);chsb(4q24);chsg(1p32);chsg(4q34);chtb(2p11.2);chsb(Xq24)	30	2	3	del(1q32),mar - del(9q21)	-X

E10	46,XY	105	0	0		32	1	1	del(15q15)+ace	-22;-21
E11	46,XX	108	1	1	chtg(17q21)	27	1	1	del(Xp)+ace	-19;-8;-X;-X;-X;-9
E12	46,XY	105	0	0		26	1	1	del(19p13.2)	-2,-3;-17
E13	46,XY	105	4	4	chtg(15q22);chtg(11q23);chtg(3q26.3);chsg(4q31)	27	2	3	del(19p13),del18q21+ace - del2q34	-3;-11;-19
E14	46,XY	105	3	3	chtg(5q13);chsb(3q28),chsg(2q24)	26	0	0		-9;-19
E15	46,XY	104	1	1	chsb(8q24.2)	31	1	1	t(1,15)(1p36;15p1.1)	-22;-10,-20
E16	46,XY	105	0	0		31	1	1	tdic	-18;-18
E17	46,XY	105	1	1	chsg(2q21)	29	0	0		-6;-15,-16;-19
E18	46,XY	105	3	4	chsg(1q21),chtg(17q21);chsg(1p36.2);chsb(15q14)	28	0	0		
E19	46,XX	104	1	1	chsg(1q32)	25	2	3	del8q21 - der(9)t(9;17),mar	-9;-21
E20	46,XY	103	3	4	chtg(5q21);chtg(17q21);chsg(1p34),chtg(17q21)	27	1	1	del14q24+ace	-18;-5;-y
E21	46,XX	105	0	0		28	1	1	mar	-15,-18;-22
E22	46,XX	101	1	1	chsb(Cq),	41	4	4	der(2)(q23)t(X;2)(q27;q23)der(x)(q27;q23) - del18p112 - del4q12 - del(7p12)+ace	-X;-X
E23	46,XX	105	2	3	chtg(4q15);chsb(17q22),chsg(6p21.2)	34	0	0		-22;-19;-4,-X
E24	46,XX	104	1	2	chsg(6p21.3),chtg(29	1	1	del(17p112)	-22;-18

					7q22)					
E25	46,XX	104	5	6	chsb(15q25);chsb(1p13),chtg(2q31);chsb(Dq);chsb(Xq25);chsb(1q24)	26	0	0		-21,-17;-9;-16
E26	46,XX	100	0	0		25	1	1	del(4q26) +ace	-16;-11;-22;-12;-19
E27	46,XX	103	2	2	chtg(2p14);chsb(Cpter)	27	2	2	mar - der(7)t(7;14)(p15;q13)der(14)t(7;14)(p15q13)	-18
E28	46,XX	101	2	3	chtg(6p11.2),chtg(6q21);chsb(12p13)	25	0	0		-14;-X;-9
E29	46,XX	104	4	4	chtg(16q22);chsg(17q21);chsb(7q32);chsb(16q23)	25	4	4	der(3)(?) - del(19p131) - ace,mar	-18;-19;-X
E30	46,XY	103	3	3	chtg(3q21);chsg(14q24);chsg(14q24)	26	1	1	del(16q23)	-22;-7;-18;-15;-14,-18
E31	46,XX	100	2	2	chtg(10q22);chtg(8q22)	32	3	4	del(8p12) - del(Xq24),mar - tdic(X;?)	-10,-X;-X;-21;-12;-22,-X
E32	46,XX	100	5	5	chsg(Cq12?);chtg(12q24.1);chtg(8q22);chtg(Cq);chsg(Bq)	25	1	2	tdic,tdic	-X;-22;-20;-19;-6;-20

E33	46,XX	102	1	1	chsb(2q13)	27	3	4	del(2q35) - mar - del(1q41),mar	
E34	46,XX	104	3	3	chtg(1p22);chsb(18q21.2);chtg(5q31)	31	1	1	del(11q13)+ace	-X
E35	46,XX	100	3	3	chtg(10q11.2);chsg(3p22);chtg(9q22)	29	3	7	del17p11.2 - der(7)(tdic(7;8)(p21;q21.1),der(19)t(19;8)t(p13.2;q21.1),del(9q22),del(2q21)+ace,mar - del11p13+ace	-X;-19;-X;-22;-13
E36	46,XY	102	1	2	chtg(17q21),chtg(9q22)	28	1	1	mar	-6;-19
E37	46,XX	105	3	3	chtb(1p31);chsb(2q34);chtg(8q24.1)	34	6	8	del(16p13.1) - mar - mar - -del6q24 - der(6),mar,mar - der(2)(t(2;2)	-15,-15
E38	46,XX	103	1	1	chtb(8q21.2)	25	0	0		-X
E39	46,XX	103	0	0		34	2	2	del1q12 - ace	-19
E40	46,XX	103	2	2	chsb(20p11.2);chtg(13q32)	33	4	4	ace - mar - del2q35 - del6p21.1	-21
E41	46,XX	100	1	1	chsb(3q26.3)	30	0	0		-15;-20;-X
E42	46,XY	102	1	1	chtg(4p15.2)	34	1	1	del5q12	-21;-19;-22;-18
E43	46,XX	100	2	2	chsb(6q22);chtg(14q24)	27	1	2	2xmar1	-22;-21

E44	46,XX	102	1	0		27	2	2	del5p15.1 - del4p14 +ace	-7;-9,-18;-21
E45	46,XX	100	1	1	chtg(6q21)	25	2	4	del(17p11.2) - del10p11.2,mar,mar	-X;-15;-19;-9;-X;-19
E46	46,XX	110	4	2	chtg(5q31);chtg(2p23)	28	3	3	mar - mar-t(1,2,20)der(1)(1;20)der(2)(1,2)dic	-X;-11;-X;-17;-9;-16;-X;-1,-10,-11
E47	46,XX	102	2	2	chtg(9q22);chtg(4q21)	25	2	2	mar - del10p13	-X;-22;-X;-14;-22;-14;-18
E48	46,XX	100	6	7	chsb(13q21),chsg(3p14);chtg(3q27);chsg(13q14);chsg(13q22);chsb(3q27);chtg(2q23)	32	0	0		-22;-21;-22;-9;-X
E49	46,XY	102	0	0		33	1	1	tdic(12;?), alteracion multiple	-21;-21;-16;-22;-18;-20;-18;-10;-21;-X
E50	46,XX	100	3	3	chtg(9q22);chtg(1q22);chtg(3q25)	25	0	0		-20;-20;-17;-21;-6;-18;-18;-19;-19;-21;-9

E51	46,XY	101	1	2	chg(1q32),chg(16q21)	30	5	5	del(12p12) - del2q(q32) - del9q13 - del18p11.2-r(3)	-2,-6;-14
E52	46,XY	101	0	0		29	0	0		-16;-21;-X,-21;-19

Annexo 2. Resultados cytogeneticos en los 44 individuos no expuestos.

No-Expuestos	Cariotipo	N° de metafases tinción uniforme	N° de metafases con lesión	Número total de lesión	Tipo de lesión cromosómica (gaps y breaks)	N° de metafases cariotipadas	N° de metafases con alteración estructural	Número de alteraciones estructurales	Tipo de alteración estructural	Alteraciones numéricas
NE1	46,XX	101	1	1	chtg(6q21)	27	0	0		-11;-9;-22
NE2	46,XX	104	0	0		49	1	1	der(18)t(17;18)(q21;q21) del(17)(q21)	-22;-3;-17;-X;-X;-19;-11;-16;-19;-18;-19;-X
NE3	46,XX	104	4	4	chtg(1q21);chtb(4q33);chsg(1p35);chtg(5q22)	27	2	1	del(9q13) - inv(14q)	-6;-13;-10;-3;-19;+X
NE4	46,XX	104	3	3	chtg(4p15.2); chsb(1p31);chsb(2q12)	26	2	2	ace - mar	-9;-8;-X;+X
NE5	46,XX	103	1	1	chtg(2q23)	26	0	0		-X;-X;-X;-X;-X-1
NE6	46,XX	101	0	0		26	0	0	(multiple trisomia,58,XX en una mf)	-19;-20;-22
NE7	46,XX	104	1	1	chsg(2q34)	29	2	2	del(17p112) - del4q12	-3;-18;-15;-22;-18;-18
NE8	46,XX	103	1	1	chtg(10q22)	26	2	3	del(17p112) - mar,mar	-19;-X
NE9	46,XX	103	0	0		28	4	4	mar - tdic(X;7)(q22;7p15) - mar - del(11q13)	-21;-12;-16;-18;+2;+13;+15
NE10	46,XX	100	0	0		27	1	1	r(17)	-X;-3;-14
NE11	46,XX	100	7	9	chtg, chsb;chsg,chsb;chsb;chtg;chtg; chtg;chtg	26	1	1	del(12p13)	-12;-17;-16;-20;-20;-20;-21
NE12	46,XY	104	2	2	chsg;chtg	28	0	0		

NE13	46,XX	109	6	7	chsb(9p13);chsb(1q23);chtb(11q12);chtg(Xq24),chtg(1q24);chsb(8q24,2);chsg(14q24)	27	1	1	del(2q)	-21;-X;+X
NE14	46,XX	105	2	3	chtg(2q23);chsg(5q31),chsg(3q21)	31	4	5	mar - del(9q13) - ace,ace -del18q21.3	-X;-7;-13;-21,-9;+7
NE15	46,XX	105	8	16	chtg,chsg,chtg;chtg;chtg;chtg;c hsg,chsb;chtg,chsg,chsg;chsg;c htb;chsg,chsg,chsg	26	2	2	del(7q32) - mar	-22;-10;-20;-22
NE16	46,XX	105	1	1	chsg,	25	2	3	mar,mar-der(X)t(X;10)	-11;-16;-20
NE17	46,XY	105	7	9	chtg(2q21),chtg(3q23);chsg(6p21.2);chsb(6p12),chtb(8q24.1);chsg(6p21.2);chtg(2q31);chtg(9q32);chtg(1q32)	25	0	0		-18;-17;-19;-16
NE18	46,XX	105	2	2	chtg(3q24);chsb(2p11.2)	26	1	1	del(11q22)	-21;-9
NE19	46,XX	105	4	4	chtg(3q21);chsg(7q36);chtg(16q21);chtg(1q24)	27	2	2	del(18p112) - del(4p16)	+21
NE20	46,XX	100	0	0		27	0	0		-X;-22;-11
NE21	46,XX	105	0	0		27	4	4	der(13)t(10;13)(10q112;13p112)+del(10q112) - del16q22- mar- del16q23	-21
NE22	46,XX	105	3	3	chtg(4q31.3);chtg(2q33);chtg(1p22)	27	1	1	del(11)(q24ter i p15pter)	-X;-9;+X
NE23	46,XX	105	3	3	chtg(16q22);chsb(5q31);chsb(2p16)	41	5	9	ace-mar1,2xmar2 - mar,mar - der(22)t(22;?)(q13;?) - del(5q11.2)+mar (ring)	-2;-9;-10;-20;+X
NE24	46,XX	105	3	4	chtg(1q32);chtg(2q23);chtg(3q26),chtg(3p14)	31	2	6	mar - mar1;mar2;3xmar3	+11
NE25	46,XX	105	0	0		28	2	3	del(16q)+ace,del(6p11.1) - del(6q23)	-18;-5,-12;-4;-21;-9;-20;-8
NE26	46,XX	105	3	3	chtg(14q24);chsg(10q24);chsb(5q31)	25	5	5	del(18p11.2) - mar-del(16q23) - del(16q23) - mar	-2;-20;-19;-5,-10;-8;-X

NE27	46,XX	103	2	3	chtg(6p21.2),chtg(16q22);chtg(Cq)	27	6	6	del16q21 - del16q21+ace - ace,del16q21 - del16q21- del16q21, ace, ace	-21;+9
NE28	46,XX	105	2	2	chsg(4q28);chtg(7q32)	27	1	2	mar;mar	-9;-21;-20;-X
NE29	46,XX	101	1	1	chtg(3p21)	27	2	2	del(18q12)+ace - der(7,?),dic	-18;-18;-22;-20;-22;-6,-19;-17,-17,-21;-8;-19;-9,-20,-21
NE30	46,XX	100	1	1	chtg(3poq)	29	1	1	ace	-19;-22;-X;-18;-X
NE31	46,XX	104	0	0		27	0	0		-9;-8;-X;-X
NE32	46,XX	105	3	3	chtg(2p);chsg(2q);chtb(3pq)	25	0	0		-21;-21;-7
NE33	46,XX	103	4	5	chsg(16q);chtg(3pq),chtg(Eq);chtg(1pq);chsg(2q)	29	2	4	del(8p22) - tdic(14;15)(q24;q23),del(14q23)+ace,mar	-6;-13;-15;-19;-11;-22;-19,-22;+X
NE34	46,XY	101	2	2	chsg(14q24);chsg(1q21)	26	0	0		-5;-20;-15;-21;-5
NE35	46,XY	100	1	1	chtg(1p32)	34	2	2	mar - del(18p112)	-9;-14;-X,-8;+1,+22;+X;+2
NE36	46,XY	102	5	5	chtg(20q13.1);chsg(17q21);chtg(Xp22.1);chtg(15q15);chtg(7q32)	35	4	6	mar- del(12q24.2) - del(2p15)+ace, mar - mar1,mar2	-19;-18;-13;-20;+21
NE37	46,XX	104	1	1	chtg(5q33)	31	0	0		-7;-9;-X;-18;-19;-X;-21;-X;-5;-X
NE38	46,XY	102	1	2	chsb(15q24),chsb(5q13)	32	4	4	der(9)t(9;9)(9q24;9p22) - mar - mar - del7q21	-10;-21
NE39	46,XY	100	1	1	chtg(6q23)	29	1	1	mar	-19;-5;-21;-19
NE40	46,XY	100	2	3	chtg(2q31);chsg(6p21),chsg(17q12)	32	2	4	t(2;17)(2p14;17q23),der(2)(2p14)der(17)(17q23)-ace,ace,ace	-13;-4;-21;-7;-13;+y;+X;+3

NE41	46,XY	101	2	2	chsg(10q22);chtg(3p14)	30	1	1	del12p13	-13;-8;-9;-8;-17;+22
NE42	46,XY	102	1	1	chtb(3p21)	31	0	0		-22;-18;-12
NE43	46,XX	103	1	1	chtg(1p34)	26	1	2	mar,mar	-X;-3;-X;-16;-X;-17;-20;-X;-17;-X;-22;-20;+12
NE44	46,XX	104	1	1	chtg(13q22)	25	2	2	mar- t(10;?)	-17;-X;-11;-20;-X;-19;+20;+16

Annexo 3. Características genómicas de las bandas afectadas.

Banda afectada	Patrón de bandas G	Lugar frágil Classic	Lugar frágil Mrasec	DS	CNVs	micro RNA
1p13	C	no	si	si	si	si
1p22	C	si	si	si	si	no
1p31	O	si	si	si	si	si
1p32	C	si	si	si	si	no
1p34	C	si	si	si	si	si
1p35	C	no	no	si	si	si
1p36	C	no	si	si	si	si
1p36.2	C	no	si	si	si	si
1q12	H	si	si	si	si	no
1q21	C	si	si	si	si	no
1q22	O	no	no	si	si	si
1q23	C	no	si	si	si	no
1q24	O	no	no	si	si	si
1q32	C	no	si	si	si	si
1q41	O	no	si	si	si	si
2p11.2	C	no	si	si	si	si
2p14	C	no	si	si	si	no
2p15	C	no	si	no	si	si
2p16	O	si	si	si	si	si
2p23	C	no	si	no	si	no
2q12	O	no	no	si	si	no
2q13	C	no	si	si	si	si
2q21	C	si	si	si	si	si
2q23	C	no	si	si	si	no
2q24	O	no	si	si	si	si
2q31	C	si	si	si	si	si
2q32	O	si	si	si	si	no
2q33	C	si	si	si	si	no
2q34	O	no	no	no	si	si
2q35	C	no	si	no	si	si
3p14	O	si	si	si	si	no
3p21	C	no	si	si	si	si
3p22	O	no	si	si	si	si
3q21	C	no	si	si	si	si
3q23	C	no	si	no	si	si
3q24	O	no	no	no	si	si
3q25	C	si	si	si	si	si
3q26	O	no	si	si	si	si
3q26.3	O	no	si	si	si	si
3q27	C	si	si	no	si	no
3q28	O	no	si	si	si	si
4p14	C	no	si	no	si	si
4p15.2	C	si	si	no	si	no
4p16	C	si	si	si	si	si
4q12	C	si	si	si	si	no
4q21	C	no	si	si	si	no
4q24	O	no	no	si	si	si
4q25	C	no	no	si	si	si

4q26	O	no	no	si	si	si
4q28	O	no	no	si	si	si
4q31	C	si	si	si	si	si
4q31.3	C	no	no	no	si	si
4q33	C	no	si	no	si	no
4q34	O	no	si	no	si	si
5p15.1	C	no	si	si	si	si
5q11.2	C	no	si	si	si	si
5q12	O	no	si	si	si	si
5q13	C	no	si	si	si	no
5q21	O	si	si	si	si	no
5q22	C	no	si	si	si	si
5q31	C	si	si	si	si	no
5q33	C	no	si	si	si	si
6p11.1	O	no	si	si	si	no
6p11.2	C	no	si	si	si	si
6p12	O	no	no	si	si	si
6p21	C	no	si	si	si	si
6p21.1	C	no	si	si	si	si
6p21.2	O	no	si	no	si	no
6p21.3	C	no	si	si	si	si
6q21	C	si	si	no	si	si
6q22	O	no	si	si	si	no
6q23	C	no	si	si	si	no
6q24	O	no	no	si	si	si
7p12	O	no	no	si	si	no
7p15	C	no	no	si	si	si
7p21	O	si	si	si	si	si
7q21	O	si	si	si	si	si
7q22	C	si	si	si	si	si
7q32	C	si	si	no	si	si
7q36	C	si	si	si	si	no
8p12	O	no	no	no	si	si
8p22	O	no	no	si	si	si
8q21	O	no	si	si	si	si
8q21.1	O	no	no	no	si	si
8q21.2	C	no	no	no	si	si
8q22	C	si	si	no	si	si
8q24.1	C	si	si	si	si	no
8q24.2	O	no	no	no	si	si
9p13	C	no	si	si	si	no
9p22	C	no	si	si	si	si
9p23	O	no	no	si	si	si
9p24	C	no	si	si	si	si
9q13	C	no	si	si	si	no
9q21	O	no	si	si	si	si
9q22	C	si	si	si	si	si
9q32	C	si	si	si	si	no
10p11.2	C	no	si	si	si	no
10p13	C	no	si	si	si	si
10q11.2	C	si	si	si	si	no
10q22	C	si	si	si	si	no

10q24	C	no	si	no	si	si
11p12	O	no	si	si	si	si
11p15	C	si	si	si	si	si
11q13	C	si	si	si	si	si
11q22	O	no	si	si	si	no
11q23	C	si	si	si	si	si
12p12	O	no	si	no	si	si
12p13	C	no	si	si	si	si
12q24.1	C	si	si	si	si	si
12q24.2	O	si	si	no	si	no
13p11.2	O	no	no	no	no	no
13q14	C	no	si	si	si	si
13q21	O	si	si	si	si	si
13q22	C	no	si	si	si	no
13q32	C	si	si	no	si	no
14q13	C	no	si	si	si	no
14q22	C	no	si	si	si	no
14q23	O	si	si	si	si	no
14q24	C	si	si	si	si	no
15p11	O	no	no	no	no	no
15q14	O	no	no	si	si	si
15q15	C	no	si	si	si	si
15q22	C	si	si	no	si	si
15q23	O	no	no	si	si	no
15q24	C	no	si	si	si	no
15q25	O	no	si	si	si	si
16p13.1	C	si	si	si	si	si
16q21	O	no	si	no	si	si
16q22	C	si	si	si	si	si
16q23	O	si	si	si	si	no
17p11.2	C	no	si	si	si	si
17q12	O	no	no	si	si	no
17q21	C	no	si	si	si	si
17q22	O	no	no	si	si	no
17q23	C	si	si	si	si	si
18p11.2	C	no	si	si	si	no
18q12	O	si	si	si	si	si
18q21	C	si	si	no	si	si
18q21.2	O	si	si	no	si	no
18q21.3	C	si	si	si	si	si
19p13.1	C	no	si	si	si	si
19p13.2	O	no	si	si	si	si
20p11.2	C	si	si	no	si	si
20q13.1	C	no	si	si	si	no
22q13	C	si	si	si	si	si
Xp22.1	C	no	no	si	si	no
Xp22.3	C	si	si	si	si	no
Xq13	C	no	si	si	si	si
Xq22	C	si	si	si	si	si
Xq24	C	no	no	si	si	no
Xq25	O	no	si	si	si	si
Xq27	O	si	si	si	si	si

ANNEXO 4. Resultados cytogenéticos de los 9 individuos en el grupo de cáncer

Individuo	Cariotipo	N° de metafases uniforme (48h)	N° de metafases cariotipados (48h)	Lesiones (48h)	Alteraciones estructurales (48h)	Alteraciones numéricas (48h)	N° de metafases uniforme (72h)	N° de metafases cariotipados (72h)	Lesiones (72h)	Alteraciones estructurales (72h)	Alteraciones numéricas (72h)
1	46,XX	100	11	ctg9q32 - ctg14q22	mar	-X	105	25	csg(Xq22) - ctg(16q22) - ctg(4q25) - ctg(6q15) - ctb(6q21) - ctb(16q12) - ctg(5q13)		
2	46,XX	106	15	csb10q22 - ctg 2p23- csg1q23	r(12)(p13- q24),t(20;22)(q 112;p112)+der (20)+der(22)	,-22;-1,-18,- 20;-17	105	29	ctg4q31- ctg1p34.2- csb2q32,csb 6p212	del2p14+ace- mar	-X-17;-15;-9;- 4;-19;22;45,- 8;-18;-X
3	46,XY	105	29	csg1q24 - csb11p15	t(2;?)(p25;?)	-X;-7	105	26	csbDq - ctb19q13.3 - ctb11q23	ace	-19;-4;-5,-12;- 21,-22;-19

4	46,XY	109	29	ctg5q12 - ctb14q12 - ctb15q15 - ctg1q32	tdic(1;14)(q42;p112),delXq22 - der(1)t(1;4)(q23;p16)der(4)t(1;4)(q23;p16),del(3)(p21),tdic(7;18)(q32;q23), t(8;2)(8q24.3;q21),del15(p14)+a ce, mar,ace,ace - tdic(2;15)(p24;q22),del(3)(p21),tdic(9;16)(q22;q24),der(19)t(19;?)(q13.3;?),ace,ace ,ace,ace - tdic(1;2)(p22;q34),del(X)(q26),mar,ace,ace - mar,mar - mar,ace - t(1;13)(q21;p11)+del(1)(q21),der(13)t(1;13)(q21;p11),der(2)t(2;?)(q12;?),t(3;22)(q12;q11.2),tdic(7;20)(q36;p13),mar,mar,ace,ace,ace - mar,mar,mar,mar - mar - ace,ace,mar,mar(dic 2&10) - der(2)t(2;22)(p111;p111)der(22)t(2;22)(p111;p111),ace(2p),ace(4q21-4qter),mar - del18p113 - del1q12,mar	-5;-17;-17,-19	0	0			
---	-------	-----	----	--	---	----------------	---	---	--	--	--

5	46,XY	104	26		ace	-16	105	28			45,XY,- 20;45,XY,- 17;45,XY,- 8;45,Y
6	46,XY	100	26	ctg5p13 - csb8p21 - ctb21q21		-17;-16,-19;-3,- 4;-Y	101	25	csg6q21 - csb12p12	4mar,3ace	45,XY,- 12;47,XXY; 45,X;45,XY,- 9; 45,XY,- 18;45,XY,-19;
7	46,XX	107	15		der(X)t(X;?)(q 26;?)	-9,-19;-20;	101	25	csg6p11.2 - csg3q24	der(1)t(1;20)(p 21;p13),der(20)t(1;20)(p21;p1 3) - mar	45,XX,- 18;45,X;45,XX , -10; 45,XX,- 10
8	46,XY	105	29	ctb2q21 - csg1q21 - ctg5q31 - csg1q21,c tg10q24 - ctg17q13 - csb14q22	mar (?)	-Y	103	29	csb7q22 - csb4q26 - ctg13q21	3ace - del5p15.2 - del16q21	45,XY,- 5;47;XY,+22
9	46,XY	103	26		der(18)t(X;18)(q24;q23),der(X)t(X;18)(q24;q 23) - del13q22	-X,-22,-Y;-4,- 9;-5,-19; - 22;+5	101	25	csb16p112		46,XY,-9,+16; 45,X,- Y;45,XY,- 9;44,XY,-5,-18

9. Agradecimientos

Recuerdo muy bien la primera visita al despacho de Carme en la UAB, cuando me explicaste el proyecto del Prestige, un proyecto muy interesante y tenía muchas ganas de empezar este nuevo trabajo. Estoy muy agradecida por toda tu ayuda durante este tiempo, gracias por animarme y ayudarme y en general por todo tu trabajo. Tenía la suerte de tener dos directoras, así he podido aprender de las dos, cosas diferentes. Gracias Cristina por tu ayuda y ánimos, tu perfeccionismo me ha enseñado mucho. Además te quiero dar especial gracias por tu ayuda técnica con las imágenes de la tesis. Aparte de toda la ayuda profesional agradezco mucho a las dos, vuestra ayuda a la hora de redactar esta tesis en castellano y el esfuerzo realizado al final, cumpliendo con los objetivos que nos habíamos propuesto.

A todo el equipo que ha llevado a cabo los dos proyectos SEPAR-Prestige y en especial a su Comité Científico constituido por Joan Albert Barbera, Francisco Rodríguez Pozo, Héctor Vereá, Jan-Paul Zock, Federico Gómez y Gemma Rodríguez-Trigo.

A los miembros del equipo de CREAL, Josep Maria Antó, Gemma Castaño-Vinyals y especialmente a Ana Espinosa por su trabajo de estadística y tratamiento de datos.

A la responsable del trabajo de campo, Emma Rodríguez-Rodríguez y al equipo médico y enfermeras de la Unidad Móvil: Ana Souto-Alonso, Luisa Vázquez M^a Luisa Rodríguez Valcarcel.

Jesús Giraldo, de la unidad de bioestadística de la Facultad de Medicina, por la ayuda estadística de la tesis.

Al equipo de genotoxicidad de la UAB: Gemma Monyarch, Gloria Biern, Fernanda de Castro Reis, Sandra Francés, Maria Dolors Coll y Carme Fuster.

Sense els companys de feina, no hagués sigut el mateix. Estar a gust a la feina es molt important per mi. Casi sempre he vingut contenta al lab, amb ganes de veure els meus companys. Mi primer año estuve más con los otros extranjeros del lab, Fernanda, Ghizlene y Miguel. Miquel nos llamaba la liga de las naciones unidas. Tuvimos buenos momentos juntos, hicimos picknics en el bosque, muchas gracias por vuestra compañía. Fernanda, moltíssimes gràcies per tot, compartir classes de pràctiques, classes de català, compartir coses del Prestige, realment va ser molt bona experiència treballar amb tu, t'he trobat a faltar. Mari Àngels Rigola, muchísimas gracias por toda tu ayuda. Siempre me has ofrecido ayuda de todo tipo y tus conocimientos de los cromosomas que me has transmitido de forma muy generosa. Además siempre te has preocupado por mi, me has llevado nueces de tu montana, hierbas de tu madre, galletas, etc. A Magda, et dono mil gracias, per tot el teu ajut amb els cariotips de aquesta tesi. La veritat es que va ser un luxe teva predisposició, mentre estaves al nostre laboratori.

Moltes gràcies als professors de la Unidad, Rosa, Montse, Jordi, Vicenç y un agraïment especial per la Joaquina, que hem coincidit molts matins on has mostrat el teu interès per mi, donant-me ànims, consells o preparant-me tes. Gràcies Imma, que em vas fer una bona ajuda amb els diferents databases, també et dono les gràcies per haver estat disponible per resoldre qualsevol dubte que he tingut. A ti Javi te agradezco muchas cosas, tanto tu ayuda técnica de photoshop, cariotipos o powerpoint como tus comentarios divertidos. Hemos coincidido con muchos temas para animar la vida, plantas, bricolaje, negocios, etc. pero aún no he visto tu gran colección de plantas. Muchas gracias a ti Agustín, mi vecino, que siempre has estado disponible para cualquier cosa, hemos coincidido muchos fines de semana en el lab y compartido nervios en la recta final de la tesis, gracias por todos tus consejos y ánimos. Jordi Ribas, moltíssimes gràcies per el teu ajut estadístic, ajut amb el ms-dos, per la teva calculadora, que la tinc més o menys robada i per deixar-me fer experiments amb els teus cabells... Gemma i Laia, moltíssimes gràcies per tot! Per els bons moments que hem passat, els vostres bons consells i ànims...Laia per escoltar i ajudar me sempre amb els powerpoints, per cridar-me per anar a dinar, per fer-me sentir part del vostre grup. Moltes gràcies a ti Sandra, per compartir preocupacions, dubtes y per resoldre temes del Prestige. Alba, Maria José, Lúdia, Rita, Marta i Keyvan moltes gràcies per la vostra companya i ajuda. Gracias Iris, transmets felicitat!!! Àngels, gràcies per la teva companya aquest anys compartint sala, el teu ajut amb extensions, colorants y pràctiques, converses de tot tipus i altres bons moments. Anna, gracias por tu ayuda con los fax, tus consejos y comentarios.

Gràcies a la gent que ja han marxat, Gemma Monyarch per ensenyar-me a cariotipar i introduir-me al projecte Prestige. Moltes gràcies Raquel per el teu ajut professional amb els meus cariotips i també per la teva companya aquest temps que vam coincidir, que per desgràcia va ser massa curt. Igualment moltes gràcies a Laia Uroz, gràcies pels teus ànims i consells, llàstima que ja no et veig mai. Albert, moltes gràcies, sempre me'n recordo de com erats de ben educat i que no podia creure que mai et cansaves de parlar amb tothom! Mariona, moltes gràcies a tu també, m'agradaria tenir una mica més de la teva disciplina.

Gràcies als meus amics del CRG, que em van animar a prendre la decisió de deixar la feina per començar aquest doctorat. Gracias a mi amiga Cristina Juanoti, que te conocí en Noruega antes de conocer a Salvador, no teniendo idea que íbamos a coincidir tanto en esta vida! Gracias por ofrecer me siempre ayuda y por ser muy buena amiga!

Gracias a la meva familia catalana, sobre tot a la meva sogra, Montserrat Torrents. Realment es un gran ajut poder comptar amb vostè per tot (preparant menjars, deixar-me el cotxe, cuidar les gallines, el gos i les plantes en nostra absència) i sobre tot, la tranquil·litat de saber que te cura dels nostres fills més bé que ningú!

Moltes gràcies també als meus cunyats, la Montse i el Josep, i els meus nebots, Júlia i Jaume. Gracies per cuidar al Oscar i Fiola tan bé!

Y finalmente quiero dar las gracias a todos los pescadores y mariscadores que han participado de forma totalmente altruista en este estudio.

Kærar þakkir til stafsfélks litningarannsóknna á Landspítalanum í Reykjavík, og þá sérstakar þakkir til Margrétar Steinarsdóttur og Jóns Jóhannesar Jónsonar, fyrir að leyfa mér að vinna á rannsóknarstofunni ykkar og fyrir að bjóða mér að halda fyrirlestur um verkefnið mitt. Gefa mér tækifæri til að kynnast litningarannsóknnum á Íslandi og síðast en ekki síst fá tækifæri til að dveljast í Reykjavík í 3 mánuði. Það var virkilega skemmtilegt að vinna með ykkur þennan tíma.

Kærar þakkir til þín, Gabriel. Mjög gott að eiga frænda í Barcelona, sem þar að auki er að vinna í svipuðum geira. Takk fyrir upplýsingar um vefsíður, góða “skrifstrauma”, matarboð og samverustundir.

Kæru systur! Sólvieg Hlín, Þuríður Helga og Þórhildur Fjóla. Takk fyrir að hvetja mig áfram, haft ómælda trú á mér, alltaf vera til staðar og hjálpa mér í gegn um erfiðleika sem upp hafa komið. Mamma og pabbi, ykkar stuðningur er ómetanlegur. Þið hafið hvatt mig endalaust áfram, alltaf verið tilbúin að hjálpa, þó að þið hafið verið langt í burtu. Ég á ykkur ótal margt að þakka. Börnin mín tvö, Óskar Helgi og Fjóla, takk fyrir að vera gleðigjafarnir í lífi mínu, takk fyrir að hafa ekki móðgast eða veriði pirruð þó ég hafi ekki haft þann tíma sem ég hefði óskað til að sinna ykkur á þessum síðustu mánuðum. Elsku Salvador, þú átt rísa stóran þátt í því að ég hafi getað gert þetta verkefni. Tilitsamari mann er ekki hægt að finna. Alltaf tilbúin til að sækja börnin og aldrei neitt vesen þó ég þyrfti að vinna lengi og lítill tími til að sinna fjölskyldunni. Þú hefur hvatt mig áfram og hjálpað mér í gegn um erfiðleika sem upp hafa komið. Takk fyrir alla þolinmæðina sem þú hefur sýnt mér og líka fyrir alla tæknilega aðstoð, hvort sem í tölvunni, með tungumálið, lesa yfir, hvað sem er. Þúsund þakkir fyrir skilninginn, aðstoðina, og síðast en ekki síst andlegan stuðning !!

Allir hinir, fjölskylda og vinir á Íslandi, takk fyrir að sýna mér vináttu og kærleika!