



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

SEGUIMIENTO DE LA SALUD DE LAS PERSONAS QUE  
PARTICIPARON EN LA LIMPIEZA DEL VERTIDO DEL  
BUQUE *PRESTIGE* SIETE AÑOS DESPUÉS DEL ACCIDENTE

Memoria que para optar al Título de Doctora presenta

**Julia Ríos Vázquez**  
**2013**

Directores: Dr. Eduardo Pásaro Méndez y Dra. Blanca Laffon Lage





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

EDUARDO PÁSARO MÉNDEZ, Doctor en Biología y Catedrático de Universidad del Área de Psicobiología del Departamento de Psicología de la Universidad de A Coruña, y  
BLANCA LAFFON LAGE, Doctora en Farmacia y Profesora Titular de Universidad del Área de Psicobiología del Departamento de Psicología de la Universidad de A Coruña,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Seguimiento de la salud de las personas que participaron en la limpieza del vertido del buque *Prestige* siete años después del accidente” presentado por Dña. Julia Ríos Vázquez para optar al Grado de Doctora en Biología ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, 8 de abril de 2013

Fdo. Eduardo Pásaro Méndez

Fdo. Blanca Laffon Lage



## **FINANCIACIÓN**

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias al proyecto de investigación “Seguimiento y nueva evaluación de la salud de los voluntarios y trabajadores que participaron en la limpieza del vertido del *Prestige*”, financiado por la Xunta de Galicia (INCITE08PXIB106155PR) y cuyo Investigador Principal fue el Dr. Eduardo Pásaro Méndez, codirector de este trabajo.



Quisiera empezar agradeciéndoles a mis directores, el Dr. Eduardo Pásaro Méndez y la Dra. Blanca Laffon Lage, el haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos para la realización de esta Tesis doctoral. Sin su ayuda, su apoyo y su dedicación nunca hubiera sido posible su conclusión. Gracias por pensar en mí y creer que podía conseguirlo.

No puedo olvidarme de mis inicios en la investigación, y por ello quiero reconocer el apoyo de la Dra. Josefina Méndez Felpeto, que siempre confió en que lo lograría y de la que he aprendido mucho en todos estos años. Quisiera destacar la manera en la que quiere y protege a su equipo.

El desarrollo de esta Tesis ha sido posible gracias al proyecto de investigación “Seguimiento y nueva evaluación de la salud de los voluntarios y trabajadores que participaron en la limpieza del vertido del *Prestige*”, financiado por la Xunta de Galicia. En dicho proyecto participó de forma muy destacada Francisco Aguilera Arriagada y para mí es obligado dedicarle esta Tesis, ya que tomó parte activa en su realización hasta su fallecimiento inesperado. Sin su trabajo no se habría hecho realidad. Sirva como reconocimiento y homenaje a una gran persona, que siempre nos contagié alegría y optimismo, investigador motivado con gran iniciativa e interés científico, cuyo trabajo y dedicación han sido merecedores de obtener el grado de Doctor.

También quisiera agradecer al laboratorio del Dr. Dietmar Fuchs de la División de Química Biológica de la Universidad Médica de Innsbruck (Austria), por la ayuda brindada para la realización de la presente Tesis doctoral al realizar los análisis de neopterina y de los productos del metabolismo del triptófano. Gracias asimismo a la Dra. Nieves Doménech García, directora del Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, por facilitar el uso de sus instalaciones para la realización de las determinaciones hormonales.

A todos mis amigos y familiares que habéis aguantado mis agobios y los malos humores que a veces causaron el estrés de la realización de este trabajo. Gracias por estar ahí siempre.

A mis padres, por todo lo que me han enseñado con su ejemplo.

A mis hijos, por ser la razón por la que intento superarme cada día.

A Sergio, por compartir su vida conmigo y caminar a mi lado.





A mis hijos

A Sergio

*No hay árbol que el viento no haya sacudido*

Proverbio hindú.

*La investigación de la verdad es, en un sentido, difícil, pero en otro fácil. Lo prueba el hecho de que nadie puede alcanzarla dignamente, ni yerra por completo, sino que cada uno dice algo acerca de la naturaleza; individualmente no es nada, o es poco lo que contribuye al conocimiento de la verdad; pero de la unión de todas las contribuciones individuales se obtiene un resultado considerable.*

ARISTÓTELES: *Metafísica*, II. I.



## Resumen

El accidente del buque *Prestige* en noviembre de 2002, representó el mayor desastre ambiental ocurrido en España y una de las mayores catástrofes en la historia de la navegación europea. Se vertieron 67.000 toneladas de petróleo con componentes altamente tóxicos para la salud humana. Como consecuencia, un gran número de personas colaboraron en las tareas de limpieza del litoral contaminado, resultando potencialmente expuestas al fuel. Estudios realizados en el momento de la exposición mostraron alteraciones a nivel genotóxico, endocrino e inmunotóxico en dichos individuos, por lo que el objetivo de este trabajo consistió en la determinación de la posible persistencia de esas alteraciones siete años más tarde. Se analizó una población compuesta por 54 pescadores y mariscadores procedentes de localidades gallegas intensamente afectadas por el vertido, que habían colaborado en su limpieza durante más de dos meses, y se comparó con un grupo de 50 controles de características similares. Se evaluaron como biomarcadores de genotoxicidad el ensayo del cometa, el test de micronúcleos y el ensayo de mutación en el receptor de las células T; como biomarcadores endocrinos la prolactina y el cortisol séricos, y como biomarcadores de inmunotoxicidad las subpoblaciones linfocitarias, diversas citoquinas circulantes, la neopterinina y los productos del metabolismo del triptófano. Los resultados obtenidos mostraron que los parámetros genotóxicos, la prolactina y la mayoría de parámetros inmunológicos retornaron a los valores basales en los individuos expuestos. Sin embargo, se observaron alteraciones en los niveles de cortisol, kinurenina, y porcentaje de linfocitos CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> que sugieren la necesidad de realizar un seguimiento de estos individuos para la detección temprana de problemas de salud que pudieran estar relacionados con el sistema endocrino o inmunológico.

## Resumo

O accidente do buque *Prestige* en novembro de 2002, representou o maior desastre ambiental ocorrido en España e unha das maiores catástrofes na historia da navegación europea. Vertéronse 67.000 toneladas de petróleo con compoñentes altamente tóxicos para a saúde humana. Como consecuencia, un gran número de persoas colaboraron nas tarefas de limpeza do litoral contaminado, resultando potencialmente expostas ao fuel. Estudos realizados no momento da exposición mostraron alteracións a nivel xenotóxico, endocrino e inmunotóxico en devanditos individuos, polo que o obxectivo deste traballo consistiu na determinación da posible persistencia desas alteracións sete anos máis tarde. Analizouse unha poboación composta por 54 pescadores e mariscadores procedentes de localidades galegas intensamente afectadas polo vertido, que colaboraran na súa limpeza durante máis de dous

meses, e comparouse cun grupo de 50 controis de características similares. Avaliáronse como biomarcadores de xenotoxicidade o ensaio do cometa, o test de micronúcleos e o ensaio de mutación no receptor das células T; como biomarcadores endocrinos a prolactina e o cortisol séricos, e como biomarcadores de inmunotoxicidade as subpoboacións linfocitarias, diversas citoquinas circulantes, a neopterin e os produtos do metabolismo do triptófano. Os resultados obtidos mostraron que os parámetros xenotóxicos, a prolactina e a maioría de parámetros inmunolóxicos retornaran aos valores basais nos individuos expostos. Con todo, observáronse alteracións nos niveis de cortisol, kinurenina e porcentaxe de linfocitos CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> que suxiren a necesidade de realizar un seguimento destes individuos para a detección temperá de problemas de saúde que puidesen estar relacionados co sistema endócrino ou inmunolóxico.

### **Abstract**

*Prestige* accident in November 2002 was the highest environmental disaster occurred in Spain and one of the top catastrophes in the history of European navigation. Sixty-seven thousand tones of oil containing compounds extremely toxic for human health were spilled. As a consequence, a huge number of people collaborated in the cleanup of the polluted shore, being potentially exposed to the oil. Studies carried out at the moment of exposure reported genotoxic, endocrine and immunotoxic alterations in those individuals, so the objective of this work was to determine the possible persistence of those alterations seven years later. A population composed of 54 fishermen from Galician villages hardly affected by the spill, who had collaborated in the cleanup for at least 2 months, was analysed and compared to a group of 50 controls with similar characteristics. We evaluated comet assay, micronucleus test and T-cell receptor mutation assay as genotoxicity biomarkers; serum prolactin and cortisol as endocrine biomarkers and lymphocyte subsets, several circulating cytokines, neopterin, and tryptophan degradation products as immunotoxicity biomarkers. The results obtained showed that genotoxicity parameters, prolactin and most immunological parameters returned to basal levels in the exposed individuals. Still, alterations observed in the levels of cortisol, kynurenine and percentage of CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> lymphocytes suggest the need to monitor these individuals for early detection of health outcomes related to endocrine or immunological systems.

---

**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VII
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. VERTIDOS DE PETRÓLEO: EL ACCIDENTE DEL <i>PRESTIGE</i></b> .....	3
<b>1.1. Composición del fuel</b> .....	4
<b>1.2. Efectos sobre la salud de los vertidos de petróleo</b> .....	6
1.2.1. Estudios <i>in vitro</i> y transferencia a través de la cadena trófica.....	7
1.2.2. Efectos tóxicos agudos, psicológicos y evaluación del riesgo toxicológico potencial.....	8
1.2.3. Genotoxicidad y toxicidad endocrina.....	15
<b>2. BIOMARCADORES</b> .....	18
<b>2.1. Biomarcadores de genotoxicidad</b> .....	19
2.1.1. Electroforesis en microgel de células aisladas (ensayo del cometa).....	19
2.1.2. Test de micronúcleos.....	20
2.1.3. Ensayo de mutación en el receptor de las células T.....	22
<b>2.2. Biomarcadores de toxicidad endocrina: prolactina y cortisol</b> .....	23
<b>2.3. Biomarcadores de inmunotoxicidad</b> .....	24
2.3.1. Subpoblaciones linfocitarias.....	25
2.3.2. Citoquinas.....	26
2.3.3. Neopterina.....	28
2.3.4. Metabolismo del triptófano.....	30
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	37
<b>1. INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</b> .....	39
<b>2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS</b> .....	40
<b>3. GENOTOXICIDAD</b> .....	41
<b>3.1. Ensayo del cometa</b> .....	41
3.1.1. Aislamiento y conservación de leucocitos.....	41
3.1.2. Estándar interno.....	42
3.1.3. Preparación de los microgeles y lisis.....	42
3.1.4. Electroforesis, neutralización y tinción.....	42
3.1.5. Captura y análisis de las imágenes.....	43
<b>3.2. Test de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis</b> .....	43

3.3. Evaluación de micronúcleos por citometría de flujo.....	45
3.4. Ensayo de mutación en el receptor de células T.....	46
<b>4. TOXICIDAD ENDOCRINA.....</b>	<b>47</b>
4.1. Análisis de prolactina.....	47
4.2. Análisis de cortisol.....	48
<b>5. INMUNOTOXICIDAD.....</b>	<b>48</b>
5.1. Subpoblaciones linfocitarias.....	48
5.2. Citoquinas circulantes en plasma sanguíneo.....	49
5.3. Determinación de neopterinina.....	51
5.4. Determinación de triptófano y kinurenina.....	51
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
1. GENOTOXICIDAD.....	58
2. TOXICIDAD ENDOCRINA.....	63
3. INMUNOTOXICIDAD.....	65
4. SINTOMATOLOGÍA.....	74
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
1. GENOTOXICIDAD.....	77
2. TOXICIDAD ENDOCRINA.....	84
3. INMUNOTOXICIDAD.....	86
4. SINTOMATOLOGÍA.....	91
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estructuras químicas de benceno (A), tolueno (B), etilbenceno (C) y <i>o</i> -, <i>m</i> - y <i>p</i> -xileno (D).....	5
<b>FIGURA 2.</b> Estructuras químicas de los PAH con capacidad carcinogénica presentes en el fuel del <i>Prestige</i> .....	6
<b>FIGURA 3.</b> Imágenes de leucocitos tras la realización del ensayo del cometa: A) célula no dañada, B) célula con daño moderado, C) célula muy dañada.....	19
<b>FIGURA 4.</b> Proceso de formación de micronúcleos (adaptada de Fenech <i>et al.</i> , 1999).....	21
<b>FIGURA 5.</b> Imágenes de células binucleadas con un micronúcleo (A) y con Un puente nucleoplásmico (B).....	21
<b>FIGURA 6.</b> Ruta de síntesis de la neopterina.	29
<b>FIGURA 7.</b> Rutas de producción de serotonina y ácido nicotínico a partir del triptófano.....	30
<b>FIGURA 8:</b> Mapa de la costa gallega mostrando la situación de las localidades de muestreo y los lugares del accidente inicial del <i>Prestige</i> y su hundimiento.....	39
<b>FIGURA 9:</b> Separación de los componentes sanguíneos en un tubo BD Vacutainer® CPT™ ....	41
<b>FIGURA 10:</b> Representación de una célula binucleada con dos micronúcleos (a), un puente nucleoplásmico (b) y una yema nuclear (c).....	44
<b>FIGURA 11.</b> Diagrama de puntos de CD3-FITC frente a CD4-PE mostrando la situación de la ventana de linfocitos mutantes para el TCR CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> (región R4).....	47
<b>FIGURA 12.</b> Diagrama de puntos de complejidad (SSC) frente a CD3-FITC para el cálculo del porcentaje de linfocitos T CD3 <sup>+</sup> (región R2).....	49
<b>FIGURA 13.</b> Fundamento de la técnica utilizada para el análisis de citoquinas circulantes: las microesferas con distinta intensidad de fluorescencia están recubiertas de anticuerpos de captura que se unen específicamente a una citoquina, y ésta a su vez se une a su anticuerpo de detección conjugado con un fluorocromo.....	50
<b>FIGURA 14.</b> Diagrama de puntos de la fluorescencia de las distintas microesferas (FL3) frente a la fluorescencia de los anticuerpos específicos para cada citoquina (FL2).....	51
<b>FIGURA 15:</b> Distribución de los individuos expuestos según el tipo de tarea de limpieza realizado.....	58
<b>FIGURA 16:</b> Efecto del uso de equipamiento protector sobre el ensayo del cometa y la frecuencia de puentes nucleoplásmicos. Las barras indican el intervalo de confianza 95% de la media. * <i>P</i> <0.05, diferencia significativa respecto al uso de mono o mascarilla.....	63
<b>FIGURA 17:</b> Efecto del uso de mascarilla sobre los parámetros neopterina, %CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> e IL4. Las barras indican el intervalo de confianza 95% de la media. * <i>P</i> <0.05, diferencia significativa respecto al uso de mono o mascarilla.....	70





---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1.</b> Vertidos de fuel de los que existen estudios epidemiológicos sobre los efectos en la salud humana (ordenados por el tamaño del vertido).....	7
<b>TABLA 2.</b> Estudios <i>in vitro</i> y estudios sobre los efectos causados por la transferencia a la cadena alimentaria de los compuestos del fuel.....	7
<b>TABLA 3.</b> Estudios epidemiológicos de toxicidad aguda y efectos psicológicos, y estudios de valoración de riesgo toxicológico potencial en poblaciones humanas expuestas a vertidos de petróleo (ordenados cronológicamente según el vertido).....	8
<b>TABLA 4.</b> Estudios epidemiológicos de genotoxicidad y toxicidad endocrina en poblaciones humanas expuestas a vertidos de petróleo (ordenados cronológicamente según el vertido).....	15
<b>TABLA 5.</b> Descripción de la población estudiada.....	57
<b>TABLA 6.</b> Resultados de los biomarcadores de genotoxicidad en las poblaciones analizadas.....	59
<b>TABLA 7.</b> Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en el ensayo del cometa, el ensayo de mutación en el TCR y test de MN por citometría de flujo.....	59
<b>TABLA 8.</b> Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en el test de MN con bloqueo de la citocinesis.....	60
<b>TABLA 9.</b> Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en el ensayo del cometa, el ensayo de mutación en el TCR y el test de MN por citometría de flujo. Modelos ajustados por edad, género y consumo de tabaco.....	61
<b>TABLA 10.</b> Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en el test de MN con bloqueo de la citocinesis. Modelos ajustados por edad, género y consumo de tabaco.....	62
<b>TABLA 11.</b> Resultados de los biomarcadores de toxicidad endocrina en los grupos de estudio.....	64
<b>TABLA 12.</b> Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las concentraciones séricas de prolactina y cortisol.....	64
<b>TABLA 13.</b> Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en los biomarcadores de toxicidad endocrina. Modelos ajustados por edad, género y consumo de tabaco.....	65
<b>TABLA 14.</b> Resultados de los biomarcadores de inmunotoxicidad en las poblaciones analizadas.....	66
<b>TABLA 15.</b> Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las concentraciones séricas de neopterina y los productos del metabolismo del triptófano.....	67
<b>TABLA 16.</b> Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las subpoblaciones linfocitarias.....	68
<b>TABLA 17.</b> Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las concentraciones de citoquinas circulantes.....	69
<b>TABLA 18.</b> Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en las concentraciones séricas de neopterina y los productos del metabolismo del triptófano.....	71
<b>TABLA 19.</b> Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en las subpoblaciones linfocitarias.....	72

**TABLA 20.** Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en las concentraciones de citoquinas circulantes..... 73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**%TDNA** (*% tail DNA*): porcentaje de ADN en la cola del cometa

**μg**: microgramos

**μl**: microlitros

**μM**: micromolar

**7AAD**: 7-amino- actinomicina D

**ADN**: ácido desoxirribonucleico

**ARN**: ácido ribonucleico

**BNMN** (*binucleated cell with micronuclei*): célula binucleada con micronúcleos

**BTEX**: alquilbencenos

**CBPI** (*cytokinesis block proliferation index*): índice de proliferación de células bloqueadas en citocinesis

**CES-D** (*center for epidemiologic studies-depression*): centro para estudios epidemiológicos-depresión

**cm<sup>3</sup>**: centímetro cúbico

**COV**: compuestos orgánicos volátiles

**COX**: ciclooxigenasa

**CPT<sup>TM</sup>** (*cell preparation tube<sup>TM</sup>*): tubo de preparación celular

**CRI-ADULT** (*coping response inventory*): inventario de respuesta de afrontamiento

**CSF**: (*colony stimulating factor*): factor estimulador de colonias

**CSIC**: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**cSt**: centistokes

**CYP**: citocromo P450

**Da**: daltons

**DAPI**: 4,6-diamidino-2-fenilindol

**DIS** (*diagnostic interview schedule*): formulario de entrevista diagnóstica

**DMSO**: dimetilsulfóxido

**EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay*): ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**EROD**: etoxiresoufin-o-deetilasa

**FBS**: suero bovino fetal

**FEF** (*forced expiratory flow*): flujo espiratorio forzado

**FEV1** (*forced expiratory volume in first second*): volumen espiratorio forzado en el primer segundo

**FISH** (*fluorescence in situ hybridization*): hibridación *in situ* fluorescente

**FITC** (*fluorescein isothiocyanate*): isotiocianato de fluoresceína

**FL**: canal de fluorescencia

**FVC** (*forced vital capacity*): capacidad vital forzada

**g**: gramos

**GADS** (*Goldberg anxiety and depression scale*): escala de Goldberg para ansiedad y depresión.

**GHQ** (*general health questionnaire*): cuestionario general de salud

**GTP**: trifosfato de guanosina

**GTPCH**: GTP ciclohidrolasa I

**h:** horas

**HADS** (*hospital anxiety depression scale*): escala hospitalaria de ansiedad y depresión

**HAP:** hidrocarburos aromáticos policíclicos

**HLA** (*human leucocyte antigen*): antígeno leucocitario humano

**HPLC** (*high-performance liquid chromatography*): cromatografía líquida de alta resolución

**IARC** (*international agency for research on cancer*): agencia internacional para la investigación del cáncer

**IDO:** indolamina 2,3-dioxigenasa

**IFN:** interferón

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**ITOPF:** *The International Tankers Owners Pollution Federation*

**kin:** kinurenina

**km:** kilómetros

**kPa:** kiloPascales

**l:** litros

**LOX :** Lipoxigenasa

**LRTS** (*low respiratory tract symptomatology*): sintomatología del tracto respiratorio inferior

**LT:** leucotrieno

**M:** molar

**m<sup>3</sup>:** metros cúbicos

**mg:** miligramos

**min:** minutos

**ml:** mililitros

**mm:** milímetros

**mM:** milimolar

**MN:** micronúcleo

**MNcit:** micronúcleos evaluados por citometría de flujo

**MNMN:** células mononucleadas con micronúcleos

**MVV:** (*maximum voluntary ventilation*): ventilación máxima voluntaria

**N:** tamaño muestral

**NADS:** sintetasa del dinucleótido nicotinamida-adenina

**NBUD** (*nuclear buds*): yemas nucleares

**ng:** nanogramos

**NK** (*natural killer*): células asesinas naturales

**nm:** nanómetros

**nM:** nanomolar

**Nº:** número

**NPB** (*nucleoplasmic bridges*): puentes nucleoplasmáticos

**°C:** grados centígrados

**PBS** (*phosphate buffered saline*): tampón fosfato

**PE** (*phycoerithrin*): ficoeritrina

**PECy5** (*phycoerithrin-cyanine 5*): ficoeritrinacianina 5

**PG:** prostaglandina

**PHA** (*phytohemagglutinin*): fitohemaglutinina  
**PI** (*propidium iodide*): yoduro de propidio  
**PTPS**: piruvato-tetrahidropterina sintetasa  
**PTSD** (*post-traumatic stress disorder*): desorden de estrés postraumático  
**RIA**: radioinmunoanálisis  
**rpm**: revoluciones por minuto  
**RPMI**: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*  
**s**: segundos  
**SCE** (*sister chromatid exchange*): intercambio entre cromátidas hermanas  
**T<sup>o</sup>**: temperatura.  
**Tc**: linfocitos T citotóxicos  
**TCR** (*T-cell receptor*): receptor de las células T  
**TCR-Mf** (*T-cell receptor mutation frequency*): frecuencia de mutación en TCR  
**TFIIH** (*transcription factor IIH*): factor de transcripción IIH  
**TGF** (*transforming growth factor*): factor transformante del crecimiento  
**Th** (*T-helper*): linfocitos T colaboradores  
**TNF** (*tumour necrosis factor*): factor de necrosis tumoral  
**Trp**: triptófano  
**U**: unidades internacionales  
**USEPA**: *Unites States Environmental Protection Agency*  
**UV**: ultravioleta  
**V**: voltios  
**W**: vatios



# *Introducción*

---





## INTRODUCCIÓN

### 1. VERTIDOS DE PETRÓLEO: EL ACCIDENTE DEL *PRESTIGE*

Desde la revolución industrial el uso de combustibles fósiles y especialmente de los derivados del petróleo se ha ido incrementando progresivamente. Y esto hace necesario su transporte desde las plataformas de extracción a todos los lugares del mundo, generalmente a través de rutas marítimas en grandes buques cargueros.

Actualmente el transporte mundial de crudo mueve entre 1.500 y 1.800 millones de toneladas al año, y esto supone una tercera parte del desplazamiento total de mercancías por mar, de las que la mitad circulan por aguas de la Unión Europea y Estados Unidos. España se localiza en una de las principales vías de entrada de los hidrocarburos europeos, lo que sitúa a nuestro país, y a Galicia en concreto, en un lugar de máxima exposición a accidentes que puedan ocasionar algún tipo de vertido de estos hidrocarburos. De hecho, en las últimas décadas la costa gallega se ha visto afectada por numerosos accidentes de petroleros. Entre ellos destacan el *Polycommander* en 1970, el *Urquiola* en 1976, el *Andros Patria* en 1978, el *Mar Egeo* en 1992, y el último ha sido el *Prestige* en 2002. Los vertidos son considerados grandes desastres ecológicos debido a que afectan enormemente tanto a ecosistemas acuáticos como terrestres y ocasionan grandes pérdidas económicas. Por medio de convenios internacionales, normas comunitarias y otras medidas se intenta proteger el medio ambiente marino, pero resulta muy difícil evaluar su correcto cumplimiento.

En los últimos 50 años se han producido 38 accidentes de petroleros de gran importancia, que afectaron a costas de diferentes países. La mayoría ocurrieron en el Mediterráneo y el oeste de Europa; estas regiones han sufrido 13 de los 20 mayores vertidos. Considerando la elevada densidad de población de estas áreas geográficas, éste es un tema de gran interés desde el punto de vista epidemiológico.

El 13 de noviembre de 2002 comienza la gran catástrofe del *Prestige*. El barco lanza un primer SOS a las 15:15h y se desencadena la tragedia, que terminaría siete días después con la rotura del barco en dos, su posterior hundimiento a 130 millas náuticas de la costa gallega y 3.500m de profundidad, y el vertido de 67.000 toneladas de petróleo de las 77.000 que transportaba (ITOPF, 2013). Se contaminaron más de 1.000 km de costa española y francesa (Bohannon y Bosh, 2003), afectando a la flora y la fauna de esta zona, especialmente dependiente de sus recursos pesqueros y marisqueros. Este accidente representó el mayor

desastre ambiental ocurrido en España y una de las mayores catástrofes ambientales en la historia de la navegación europea. Esto hizo que la población se volcara totalmente en impedir que la tragedia fuera mayor, sumándose a las labores de limpieza y recuperación de la zona costera para tratar de minimizar el impacto del vertido sobre los recursos naturales y económicos. Más de 300.000 personas, procediendo unas 60.000 de fuera de Galicia, se implicaron en la limpieza del fuel, que se prolongó durante 10 meses. Debido a ello, los individuos que participaron en las labores de limpieza constituyeron una población expuesta al fuel y era necesario llevar a cabo la evaluación de las posibles consecuencias para su salud.

### 1.1. Composición del fuel

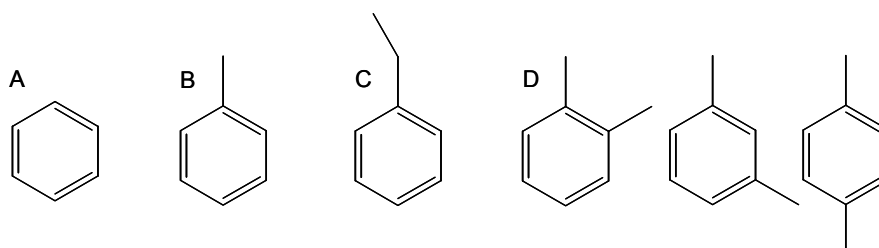
La Agencia de Protección Medioambiental Norteamericana (USEPA, de *United States Environmental Protection Agency*) clasifica los productos refinados del petróleo en 8 clases diferentes denominadas gasolina, queroseno, fuel de los números 2 a 6, y aceite lubricante, la mayoría de las cuales están clasificadas como posibles carcinógenos humanos por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, de *International Agency for Research on Cancer*) en el grupo 2B (IARC, 1989), como es el caso del fuel que transportaba el *Prestige*.

El fuel del *Prestige* fue clasificado como fuel pesado nº 2 en la escala francesa (Normas AFNOR NF M 15-010 a 15-013) o fuel nº 6 en la denominación anglosajona (USEPA). Era el producto resultante del refinado del petróleo crudo, muy denso ( $0.99\text{g/cm}^3$ ), viscoso (30000cSt a 15°C) y difícilmente soluble en agua, lo que ocasionó que pudiese llegar a la orilla en forma de manchas pegajosas que se adhirieron a la superficie en la costa (Zakaria *et al.*, 2001).

El análisis de este fuel realizado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CSIC) reveló que contenía 50% de hidrocarburos aromáticos, 22% de hidrocarburos saturados y 28% de resinas y asfaltenos (CSIC, 2003a). Además, se encontraron altas concentraciones de zinc, cadmio y plomo, y otros metales pesados como el aluminio o el níquel, en la columna de agua tras el naufragio y en el fuel emulsionado que alcanzó la costa, respectivamente (CSIC, 2003b; Prego y Cobelo-García, 2004). Hay tres grupos de compuestos presentes en el fuel a los que se les debe prestar más atención por su toxicidad para la salud humana; son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los compuestos orgánicos volátiles (COV) y los metales pesados. De hecho, según la normativa europea (Directiva 93/67/CEE, Reglamento 793/93 del Consejo y Reglamento 1488/94 de la Comisión), estos tres grupos son en los que se debe centrar la evaluación del riesgo de la exposición.

Se clasifica como COV a toda sustancia formada por átomos de carbono cuya presión a vapor a 200°C sea como mínimo 0.13kPa, a excepción del CO, CO<sub>2</sub>, compuestos organometálicos y ácidos orgánicos. Sus principales fuentes son de origen antropogénico, por la utilización de combustibles fósiles en industrias y vehículos. Estas emisiones han alcanzado niveles tan altos que se consideran un problema medioambiental y para la salud humana, ya que se sabe que muchos de los COV son tóxicos e incluso pueden ser mutágenicos y/o carcinogénicos (benceno, estireno, etc.), lo que es más peligroso teniendo en cuenta que son compuestos altamente volátiles y que acceden con facilidad a nuestro organismo por vía respiratoria.

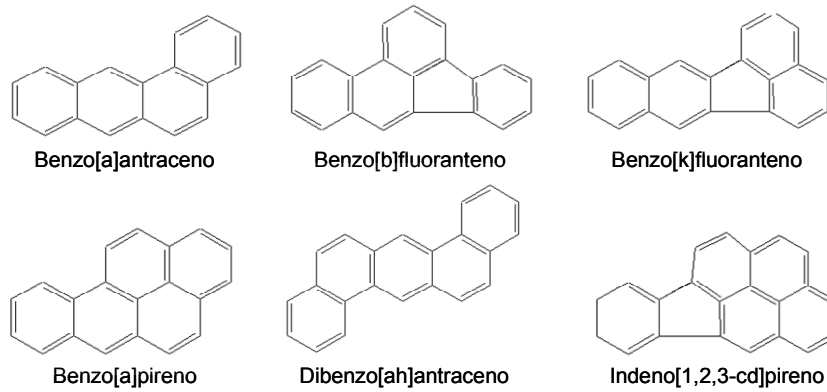
En este grupo, en base a su toxicidad, es de gran importancia el benceno y los alquilbencenos – tolueno, etilbenceno y xilenos – (BTEX) (Figura 1). Todos ellos suelen encontrarse en las fracciones ligeras de los destilados del petróleo. En el caso del fuel del *Prestige*, la concentración media inicial de benceno fue de 59mg/kg y la de BTEX de 345mg/kg, aunque estas concentraciones descendieron rápidamente (CSIC, 2003c).



**FIGURA 1:** Estructuras químicas de benceno (A), tolueno (B), etilbenceno (C) y *o*-, *m*- y *p*-xileno (D).

La producción de HAP también se acentuó con la utilización de combustibles fósiles, aunque se pueden generar en otros procesos de tipo siderúrgico y en la producción de alquitrán y asfaltos. Actualmente se sabe que los principales efectos sobre la salud humana de estos compuestos son debidos a su alta capacidad genotóxica – incluyendo mutagénica, carcinogénica y teratogénica – y se les considera productos procarcinógenos e inductores tumorales (Chan *et al.*, 2006). Existen estudios que han demostrado la capacidad carcinogénica de los HAP en animales de laboratorio y en el hombre, ya que en pequeñas cantidades y con periodos cortos de latencia llegan a producir tumores malignos de piel y otros tejidos epiteliales (Nishikawa *et al.*, 2005). Los HAP tienen afinidad por el ADN, ARN y proteínas, lo que facilita que se inserten en su estructura y formen enlaces covalentes, siendo este proceso el desencadenante de la carcinogénesis química (Borgert *et al.*, 1993). Entre los HAP presentes en el fuel del *Prestige*, seis han sido catalogados por la IARC como susceptibles de

ser carcinogénicos para humanos [benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno y dibenzo(ah)antraceno en el grupo 2A, y benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno en el grupo 2B] (Figura 2).



**FIGURA 2:** Estructuras químicas de los HAP con capacidad carcinogénica presentes en el fuel del *Prestige*.

El tercer grupo de elementos presentes fue que requieren especial atención por sus efectos sobre la salud son los metales pesados. Son agentes altamente tóxicos tanto a corto como especialmente a largo plazo, principalmente debido a su capacidad de bioacumulación. Están clasificados como tóxicos por la USEPA y la IARC, y están implicados en numerosos procesos toxicológicos derivados de su capacidad para desnaturalizar macromoléculas. Muchos de ellos actúan también alterando la fidelidad de la transcripción del ADN, generando mediadores apurínicos o compitiendo con metales esenciales necesarios para la estabilización de las macromoléculas (Léonard y Bernard, 1993).

## 1.2. Efectos sobre la salud de los vertidos de petróleo

Los efectos nocivos de los vertidos de petróleo sobre diversas especies marinas, especialmente aves e invertebrados, han sido profusamente estudiados. Sin embargo, sólo hay unos pocos estudios que han evaluado las repercusiones de la exposición al fuel para la salud humana (revisado en Aguilera *et al.*, 2010). La Tabla 1 muestra un resumen de las principales características de aquellos vertidos para los que se han realizado estudios epidemiológicos sobre los efectos para la salud humana.

Dichos estudios pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de efecto analizado en efectos agudos y psicológicos, y efectos genotóxicos y endocrinos, aunque también resultan de

interés algunos estudios realizados con el fuel *in vitro* y otros sobre la bioacumulación y transferencia de los compuestos del fuel a través de la cadena alimentaria.

<b>TABLA 1:</b> Vertidos de fuel de los que existen estudios epidemiológicos sobre los efectos en la salud humana (ordenados por el tamaño del vertido)			
<b>Accidente</b>	<b>Fecha</b>	<b>Localización</b>	<b>Cantidad vertida (t)</b>
<i>Deepwater Horizon</i>	22 abril, 2010	Golfo de México, EEUU	779.000
<i>MV Braer</i>	5 enero, 1993	Islas Shetland, Escocia, Reino Unido	85.000
<i>Sea Empress</i>	15 febrero, 1996	Milford Haven, Reino Unido	72.000
<i>Prestige</i>	19 noviembre, 2002	Galicia, España	67.000
<i>Exxon Valdez</i>	24 marzo, 1989	Prince William, Alaska, EEUU	37.000
<i>Tasman Spirit</i>	26 julio, 2003	Karachi, Pakistán	37.000
<i>Erika</i>	12 diciembre, 1999	Penmarch, Bretaña, Francia	20.000
<i>Hebei Spirit</i>	7 diciembre, 2007	Taeon, Corea	10.900
<i>Nakhodka</i>	2 enero, 1997	Noreste Oki, Mar de Japón, Japón	>6.000

#### 1.2.1. Estudios *in vitro* y de transferencia a través de la cadena trófica

De toda la serie de catástrofes de vertidos de petróleo, únicamente se han realizado estudios de este tipo tras el naufragio del *Erika*, el 12 de diciembre de 1999 frente a las costas francesas, con el resultado de un vertido de 20.000 toneladas de fuel. Estos estudios se resumen en la Tabla 2.

<b>TABLA 2:</b> Estudios <i>in vitro</i> y estudios sobre los efectos causados por la transferencia a la cadena alimentaria de los compuestos del fuel			
<b>Accidente – Referencia</b>	<b>Características del estudio</b>	<b>Métodos</b>	<b>Resultados</b>
<i>Erika – Amat-Bronnert et al. (2007)</i>	Genotoxicidad <i>in vitro</i> de un extracto de fuel en células humanas de epitelio bronquial y hepáticas	Aductos en el ADN. Expresión de las proteínas CYP 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, COX1, COX2 y 5-LOX. Detección de LTB4 y PGE2.	Formación de aductos e inducción de CYP1A2, COX2 y 5-LOX en células hepáticas. Formación de LTB4 en células bronquiales
<i>Erika – Lemiere et al. (2005)</i>	Genotoxicidad asociada al consumo de mejillones contaminados por fuel en ratas alimentadas de 2 a 4 semanas	Ensayo del cometa en células hepáticas, médula ósea y células sanguíneas	Relación dosis-efecto-tiempo en células hepáticas y médula ósea. Sin efecto en células sanguíneas
<i>Erika – Chaty et al. (2008)</i>	Inducción de CYP1A1 asociada al consumo de mejillones contaminados con fuel en ratas alimentadas 2 días	Expresión de CYP1A1 y actividad catalítica EROD en hígado	Inducción transitoria de CYP1A1 y actividad EROD

COX, Ciclooxygenasa; CYP, citocromo P450; EROD, etoxiresorufin-O-deetilasa; LOX, lipooxygenasa; LT, leucotrieno; PG, prostaglandina.

Estos estudios muestran evidencias de la bioacumulación de los compuestos del petróleo y su transferencia a la cadena trófica cuando se consumen alimentos marinos contaminados con petróleo, y demuestran la inducción de daño en el ADN causada por los productos generados como consecuencia de la actividad metabólica de las enzimas, las cuales son capaces de transformar muchos contaminantes en compuestos intermediarios aun más tóxicos que los iniciales, como es el caso de muchos metabolitos de los HAP. A este respecto, Brorasmussen (1996) indica que aunque las sustancias tóxicas en bajas concentraciones pueden no ser letales para los humanos de manera inmediata, sí pueden llegar a constituir un riesgo para la salud en caso de ingestión crónica, dependiendo de su potencial de bioacumulación al ascender en la cadena trófica.

### 1.2.2. Efectos tóxicos agudos, psicológicos y evaluación del riesgo toxicológico potencial

Los estudios existentes sobre los posibles efectos tóxicos agudos y psicológicos en poblaciones humanas expuestas a vertidos de petróleo se resumen en la Tabla 3, incluyendo también dos trabajos, realizados tras el vertido del *Erika*, que evaluaron el riesgo toxicológico potencial.

<b>TABLA 3:</b> Estudios epidemiológicos de toxicidad aguda y efectos psicológicos, y estudios de valoración de riesgo toxicológico potencial en poblaciones humanas expuestas a vertidos de petróleo (ordenados cronológicamente según el vertido)			
<b>Accidente – Referencia</b>	<b>Características del estudio</b>	<b>Métodos</b>	<b>Resultados</b>
<i>Exxon Valdez – Palinkas et al.</i> (1992)	Transversal. Diferencias étnicas en estrés, superación y síntomas depresivos en nativos (N=188) y euro-americanos (N=371)	Escala CES-D	Nivel de exposición asociado significativamente a la puntuación CES-D en ambos grupos. Los nativos tuvieron puntuación significativamente mayor en síntomas depresivos. En euro-americanos se percibía el soporte familiar como moderador de los efectos de la exposición sobre los síntomas depresivos
<i>Exxon Valdez – Palinkas et al.</i> (1993)	Transversal, 1 año después del vertido. Patrones comunitarios de desórdenes psiquiátricos en los expuestos (N= 437) y controles (N= 162)	Escala CES-D. Encuesta del Instituto Nacional de Salud y Diagnóstico Mental	El grupo expuesto mostró mayor prevalencia de desorden de ansiedad generalizada y niveles CES-D $\geq$ 16 y 18. Las mujeres expuestas fueron particularmente vulnerables
<i>Exxon Valdez – Gill y Picou</i> (1998)	Longitudinal (4 años). Estrés comunitario crónico y efectos sociales en residentes: 1989 (N=118), 1991 (N=228), 1992 (N=152) y controles: 1989 (N=73), 1991 (N=102), 1992 (N=41)	Cuestionarios de deseos migratorios, expectativas y desórdenes sociales. Estrés psicológico por Escala de Eventos.	Los datos revelaron la naturaleza crónica del estrés. En residentes se incrementaron las expectativas y deseos migratorios, y se observaron altos niveles de estrés psicológico relacionado con el evento, disminuyendo con el tiempo

TABLA 3: (Continuación)			
Accidente – Referencia	Características del estudio	Métodos	Resultados
<i>Exxon Valdez – Palinkas et al. (2004)</i>	Transversal, 1 año después del vertido. Diferencias étnicas en síntomas de PTSD en nativos (N=188) y euro-americanos (N=371)	Forma modificada de la versión III del DIS	Altos niveles de desórdenes sociales se asociaron con PTSD en ambos grupos étnicos. El bajo soporte familiar, la participación en tareas de limpieza, y un descenso en actividades de subsistencia se asociaron significativamente con PTSD sólo en nativos
<i>MV Braer – Campbell et al. (1993)</i>	Transversal. Efectos agudos iniciales en residentes (N=420) y controles (N=92)	Cuestionarios de síntomas agudos, capacidad de flujo respiratorio, hematología, tests de función renal y hepática, toxicología en sangre y orina	Efectos principales sobre la salud durante días 1 y 2 (dolores cabeza, picor de ojos, e irritación de garganta). No hubo diferencias significativas entre expuestos y controles para ninguno de los marcadores biológicos. Los estudios toxicológicos no mostraron que la exposición afectase a la salud humana
<i>MV Braer – Campbell et al. (1994)</i>	Transversal. Seguimiento después de 6 meses de efectos agudos en residentes (N=344) y controles (N=77)	Cuestionario general de salud. Capacidad de flujo respiratorio, análisis de orina y sangre, y tests de función renal y hepática	El resultado del cuestionario general de salud fue mejor para los expuestos que para los controles. Los expuestos tuvieron mayor puntuación global de síntomas somáticos, ansiedad e insomnio, pero no de disfunción personal y depresión severa
<i>MV Braer – Crum (1993)</i>	Transversal. Afectación del tracto respiratorio en niños que viven cerca del naufragio del <i>Braer</i> (N=44 a los 3 días y 56 a los 9-12 días después del vertido de fuel)	Tasa de capacidad de flujo respiratorio	La tasa de capacidad de flujo respiratorio estuvo dentro del rango normal en ambas partes del estudio, y no se vio deterioro durante el periodo del estudio
<i>Sea Empress – Lyons et al. (1999)</i>	Transversal. Efectos agudos y psicológicos en expuestos (N=539) y controles (N=550)	Cuestionarios de síntomas agudos. Escalas HAD y SF-36	Los expuestos mostraron puntuaciones significativamente más altas de ansiedad y depresión, peor salud mental y comunicaron dolores de cabeza e irritación de ojos y garganta
<i>Sea Empress – Gallacher et al. (2007)</i>	Transversal. Sintomatología aguda atribuible a la exposición psicológica en expuestos (N=794) y controles (N=791)	Cuestionarios de síntomas agudos tóxicos y no tóxicos y escala de ansiedad y depresión	El riesgo percibido estuvo asociado con un aumento de la ansiedad y síntomas no tóxicos. Los síntomas tóxicos encontrados se asociaron con la exposición al fuel y aumento de riesgo percibido
<i>Nakhodka – Morita et al. (1999)</i>	Transversal. Problemas agudos de salud en expuestos (N=282)	Cuestionarios de síntomas agudos y tóxicos. Dosímetros personales de aire para medir los carcinógenos benceno, tolueno y xileno. Niveles de toxicidad en orina	Los niveles de hidrocarburos en el aire fueron muy inferiores a los límites ocupacionales aceptables. Los principales quejas de síntomas fueron dolor en la parte baja de la espalda, dolor de cabeza, y síntomas en ojos y garganta

TABLA 3: (Continuación)			
Accidente – Referencia	Características del estudio	Métodos	Resultados
<i>Erika – Schvoerer et al. (2000)</i>	Transversal. Efectos agudos en la salud de los expuestos (N=3.669)	Cuestionarios y entrevistas telefónicas sobre síntomas agudos	Los principales síntomas agudos descritos fueron dolor lumbar, migraña, dermatitis, irritación ocular, problemas respiratorios y náuseas. La duración de los trabajos de limpieza fue identificado como un factor de riesgo
<i>Erika – Baars (2002)</i>	Valoración del riesgo toxicológico potencial para la población involucrada en las áreas de limpieza y para los turistas	Caracterización de riesgo en base a suposiciones de la exposición potencial durante actividades de limpieza y turísticas	Para la gente que había tenido las manos en contacto con el fuel se describió incremento del riesgo de desarrollar irritaciones de piel y dermatitis, y riesgo muy limitado de desarrollar tumores de piel.
<i>Erika – Dor et al. (2003)</i>	Valoración del riesgo toxicológico potencial después de la descontaminación de 36 playas contaminadas por el vertido del <i>Erika</i> y 7 playas control.	Determinación de los 16 HAP seleccionados por la USEPA en arena, agua y superficie de rocas. Se contemplaron 7 escenarios de exposición para la gente en las playas, y se seleccionaron los valores toxicológicos disponibles más conservadores para computar los riesgos	La arena y el agua estuvieron ligeramente contaminados, con valores similares a los encontrados en las playas control. Las áreas rocosas estaban todavía altamente contaminadas. No se encontró riesgo letal para un niño que accidentalmente ingirió una pequeña bola de fuel. El riesgo durante toda la vida de tener un cáncer de piel y otros tipos de cánceres fue de $10^{-5}$ en escenarios que implicasen contacto con las rocas contaminadas. El cociente de daño de efectos teratogénicos fue muy pequeño, excepto en escenarios donde mujeres embarazadas caminase entre las rocas con altos niveles de contaminación
<i>Prestige – Suárez et al. (2005)</i>	Transversal. Problemas agudos de salud entre sujetos involucrados en las operaciones de limpieza después del vertido (N=800)	Cuestionario de condiciones de exposición, problemas agudos de salud y uso de material protector	Alta prevalencia de heridas en el personal de limpieza de las aves. Trabajar más de 20 días en áreas altamente contaminadas se asoció con un incremento del riesgo de heridas en todos los trabajadores. Los efectos tóxicos fueron altos entre los marineros. No observaron patologías severas
<i>Prestige – Carrasco et al. (2006)</i>	Transversal. Asociación entre la información sobre salud, el uso de medidas protectoras y la incidencia de problemas agudos de salud en expuestos (N=799)	Cuestionario de condiciones de exposición, problemas agudos de salud, uso de material protector e información recibida sobre la protección de la salud	Recibir información sobre la protección de la salud se asoció al uso de dispositivos protectores. Los sujetos no informados registraron un exceso de riesgo significativo de picor de ojos, náuseas/vómitos/mareos, dolores de cabeza y garganta, y problemas respiratorios. Los marineros, el grupo más expuesto, fueron los peor informados y registraron la frecuencia más alta de problemas toxicológicos



TABLA 3: (Continuación)			
Accidente – Referencia	Características del estudio	Métodos	Resultados
<i>Prestige – Zock et al. (2007)</i>	Longitudinal, 12-24 meses después del vertido. Asociación entre la participación en trabajos de limpieza y síntomas respiratorios en expuestos (N= 6.780)	Cuestionarios con información cualitativa y cuantitativa de las actividades de limpieza y problemas respiratorios	El riesgo de LRTS se incrementó con el número de días de exposición, horas de exposición al día y número de actividades. El incremento de riesgo de LRTS descendió con el tiempo transcurrido desde la última exposición
<i>Prestige – Carrasco et al. (2007)</i>	Transversal. Calidad de vida relacionada con la salud y salud mental en residentes después de 16 meses (N=1.350) y controles (N=1.350)	Cuestionarios de percepción de soporte social y salud mental SF-36, GHQ-28, HADS y GADS	El SF-36 mostró que los residentes en la costa tenían una baja probabilidad de registrar valores subóptimos en funciones físicas y dolor corporal, y una mayor frecuencia de niveles subóptimos en salud mental
<i>Prestige – Sabucedo et al. (2009)</i>	Transversal. Impacto psicológico en sujetos de 23 localizaciones costeras de tres zonas según su proximidad a la localización del vertido (N=938)	Cuestionarios sobre percepción de soporte social e implicación, satisfacción con la ayuda económica recibida y relaciones sociales. Versión modificada del CRI-ADULT. Versión simplificada del SCL-36	Los sujetos afectados recibieron un buen apoyo social y estuvieron satisfechos con la ayuda económica recibida. Los afectados que tuvieron alto grado de apoyo y tasa de satisfacción estaban en una mejor situación que otros con bajas tasas, e incluso mejor que los no afectados
<i>Prestige- Sabucedo et al. (2010)</i>	Transversal, un año después Impacto en la salud mental y la percepción de salud física y capacidad funcional en residentes (N=926)	Escalas de síntomas clínicos (SCL-36) y de calidad de vida y salud (SF-36)	Los individuos muy expuestos o que vivían muy cerca de los lugares contaminados presentaron menor nivel de salud mental. Las mujeres y los pescadores sufrieron más que otros grupos las consecuencias del desastre
<i>Prestige –Zock et al. (2012)</i>	Transversal. Persistencia de síntomas respiratorios 5 años después del vertido en marineros expuestos (N=466) y no expuestos (N=156)	Cuestionarios con información cualitativa y cuantitativa sobre las actividades de limpieza y problemas respiratorios	La participación en tareas de limpieza del vertido puede provocar sintomatología respiratoria que se mantiene 5 años después de la exposición
<i>Tasman Spirit – Janjua et al. (2006)</i>	Transversal. Efectos agudos sobre la salud en residentes expuestos (N=216) y controles que vivían a 2km (N=83) y 20km (N=101) de distancia de la costa	Cuestionarios sobre síntomas agudos de salud y percepción del papel del vertido en la producción de enfermedades y ansiedad por el efecto del vertido en la salud	Los datos mostraron asociación de moderada a fuerte entre el grupo de expuestos y los síntomas. Hubo una tendencia al descenso de prevalencia de síntomas específicos con el incremento de la distancia al lugar del vertido
<i>Tasman Spirit – Khurshid et al. (2008)</i>	Transversal. Parámetros de salud de gente que trabajaba y vivía en las cercanías de una playa contaminada por fuel (N=100)	Contenido de hidrocarburos en muestras de agua del mar y arena. Parámetros hematológicos y bioquímicos. Tests de función renal y hepática	El agua del mar no contenía trazas de hidrocarburos. Se incrementaron ligeramente los niveles de linfocitos y eosinófilos. 11 personas mostraron elevaciones de transaminasas no significativas

TABLA 3: (Continuación)			
Accidente – Referencia	Características del estudio	Métodos	Resultados
<i>Tasman Spirit – Meo et al. (2008)</i>	Transversal. Función pulmonar en expuestos (N=20) y controles (N= 31)	Espirometría	Reducción significativa en FVC, FEV <sub>1</sub> , FEV <sub>25%-75%</sub> y MVV en expuestos. Los parámetros de función pulmonar mejoraron cuando los individuos fueron retirados del ambiente contaminado
<i>Hebei Spirit – Lee et al. (2009)</i>	Transversal. Efectos de las medidas de protección en residentes (N=288) y voluntarios (N=724) en tareas de limpieza	Cuestionarios. Análisis de orina para COV, HAP y 6 metales pesados	Los niveles de fatiga y fiebre fueron mayores en los que no usaron mascarilla. Los niveles de mercurio en orina fueron significativamente más elevados en los que no usaron ropa y botas adecuadas
<i>Hebei Spirit – Cheong et al. (2011)</i>	Transversal. Síntomas físicos en residentes participantes en las tareas de limpieza del vertido (N=288) y controles (N=39)	Cuestionarios de síntomas físicos, características sociodemográficas y actividad limpieza. Análisis de orina para COV, HAP y metales pesados	La sintomatología física se asoció con el nivel de exposición. Se propone seguimiento a largo plazo de los participantes
<i>Hebei Spirit – Ha et al. (2012)</i>	Transversal. Exposición y efectos agudos en los voluntarios en tareas de limpieza (N=565)	Cuestionarios sobre síntomas físicos. Análisis de orina para COV y HAP antes y después de la exposición	Incremento de síntomas físicos (visuales, nasales, irritación bronquial, dolor de cabeza, palpitaciones, fatiga, dolor abdominal). Los niveles de ácido <i>t,t</i> -mucónico, ácido mandélico y 1-hidroxipireno fueron más elevados después de la limpieza. Proponen seguimiento a largo plazo
<i>Hebei Spirit – Na et al. (2012)</i>	Transversal, un año después. Duración de los problemas de salud en los implicados en las operaciones de limpieza (N=442)	Cuestionario sobre factores demográficos, factores de riesgo y continuación y duración de síntomas	Los síntomas que más se prolongaron fueron los oculares, dolor de cabeza, dermatológicos y neurovestibulares
<i>Deepwater Horizon- Abramson (2010)</i>	Transversal. Impacto del vertido a nivel psicológico en niños y familias de la zona (N=1.203)	Cuestionarios sobre salud física y mental	El vertido provocó incertidumbre y miedos en la población, cambios de hábitos por las zonas de juego y modificó planes familiares.
<i>Deepwater Horizon – Grattan et al. (2011)</i>	Transversal. Síntomas agudos de depresión y ansiedad, mecanismos de adaptación, y percepción del riesgo en residentes de comunidades pesqueras impactadas indirectamente (N=71) o directamente (N=23) por el vertido	Cuestionarios de valoración de síntomas psicológicos, de adaptación, neurocognitivos y percepción del riesgo	No hubo diferencias significativas entre las dos comunidades. Los residentes de ambas comunidades mostraron depresión y ansiedad clínicamente significativas. Los participantes con pérdida de ingresos relacionada con el vertido presentaron puntuaciones significativamente peores de todos los síntomas

TABLA 3: (Continuación)			
Accidente – Referencia	Características del estudio	Métodos	Resultados
<i>Deepwater Horizon</i> – Osofsky <i>et al.</i> (2011)	Transversal. Efectos sobre la salud mental de residentes en el sureste de Louisiana (N=452)	Entrevistas telefónicas y personales	Los mayores efectos sobre la salud mental se relacionaron con el grado de alcance y afectación de la vida, el trabajo, la familia y la vida social, con incremento de ansiedad, depresión y estrés postraumático
<i>Deepwater Horizon</i> – Buttke <i>et al.</i> (2012)	Transversal, un año después. Evaluación de la salud mental en residentes (N=210)	Cuestionarios de evaluación de salud mental; se compararon los resultados con los iniciales de 2010	Los síntomas de salud mental fueron mayores en las áreas estudiadas que los generales nacionales, pero menores que en 2010

CES-D, *Center for epidemiologic studies depression*; COV, compuestos orgánicos volátiles; CRI-ADULT, *coping response inventory*; DIS, *diagnostic interview schedule*; FEF25%-75%, *forced expiratory flow*; FEV1, *forced expiratory volume in first second*; FVC, *forced vital capacity*; GADS, *Goldberg anxiety and depression scale*; GHQ, *general health questionnaire*; HADS, *hospital anxiety depression scale*; HAP, hidrocarburos aromáticos policíclicos; LRTS, *low respiratory tract symptomatology*; MVV, *maximum voluntary ventilation*; PTSD, *post-traumatic stress disorder*, SCL-36, *symptom checklist-36*; SF-36, *short form-36*.

La mayor parte de los trabajos recopilados son estudios transversales que muestran el desarrollo de efectos agudos (irritaciones oculares, mucosas, de la piel, de garganta, problemas respiratorios), de alteraciones en funciones fisiológicas (hepática o renal), o de efectos psicológicos (ansiedad, depresión, estrés postraumático) a causa de la exposición al fuel durante las tareas de limpieza. Algunos de estos trabajos concluyen que las consecuencias de la exposición disminuyen con el tiempo y que son en su mayor parte reversibles. No obstante, algunos de estos trabajos no incluyen una población control de referencia, lo que hace que los datos que proporcionan sean difíciles de interpretar. Por otra parte, los dos trabajos que evaluaron el riesgo toxicológico potencial – basados en estimaciones teóricas, no en datos experimentales – concluyeron que, en general, la exposición no entraña riesgos significativos para la salud.

A continuación se describirán en mayor detalle los estudios realizados en poblaciones expuestas al fuel del *Prestige*, por ser el objeto principal del presente trabajo. Suárez *et al.* (2005) analizaron las condiciones de exposición y los efectos agudos para la salud en los individuos que participaron en las labores de limpieza en las regiones de Asturias y Cantabria, y la relación entre éstos y el tipo de trabajo desempeñado. Entrevistaron a 400 individuos de cada región y recogieron datos acerca del tipo de trabajo realizado, los equipos de protección personal utilizados y los síntomas agudos que tenían. Los trabajadores que estuvieron a cargo de la limpieza de las aves registraron la más alta prevalencia de lesiones (19%), incluyendo alteraciones neurovegetativas (11.2%) y dolor lumbar (3.1%). Los periodos de trabajo

superiores a 20 días en áreas altamente contaminadas se asociaron a un incremento en el riesgo de heridas. Sin embargo, no se observaron efectos severos entre los individuos analizados.

Estos mismos autores realizaron otro estudio en el que examinaron la relación entre el uso de equipos de protección, la frecuencia de problemas agudos de salud y la información recibida sobre la protección de la salud en 799 individuos expuestos, clasificados según las tareas realizadas (Carrasco *et al.*, 2006). Con él confirmaron los resultados obtenidos en el anterior trabajo y encontraron una asociación significativa de la formación adecuada en protección de la salud con el uso de equipamiento protector y una menor frecuencia de problemas de salud.

En 2007 Carrasco *et al.* realizaron un nuevo estudio acerca de los efectos del vertido sobre la calidad de vida relacionada con la salud y sobre la salud mental de la población afectada 18 meses después del desastre. Por medio de cuestionarios concluyeron que no se encuentra descenso en la calidad de vida ni empeoramiento de la salud mental en los individuos expuestos, aunque en alguna de las escalas aplicadas se observó un ligero impacto en la salud mental de los residentes de las áreas afectadas.

Sabucedo *et al.* (2009) también evaluaron el impacto psicológico del vertido en 938 individuos de 23 localidades de la costa gallega. La mitad de ellos eran pescadores o personal implicado en la extracción de recursos pesqueros y la otra mitad no estaban relacionados con estas actividades. Utilizando cuestionarios sobre factores psicosociales y psicológicos los resultados mostraron que los individuos habían recibido buena asistencia social y estaban satisfechos con la ayuda económica proporcionada. Aquellos que se correspondían con elevadas puntuaciones de ayuda y satisfacción estaban en una mejor situación que los de bajas puntuaciones, e incluso mejor que los no afectados.

Zock *et al.* (2007) evaluaron la prevalencia de sintomatología del tracto respiratorio inferior alrededor de un año después del accidente del *Prestige* en 6.780 pescadores que participaron en las labores de limpieza, a través de cuestionarios que incluyeron aspectos cualitativos y cuantitativos. Los resultados indicaron que el riesgo de padecer esta sintomatología se incrementó con la cantidad de días de exposición, horas de exposición por día y número de actividades realizadas. El riesgo fue descendiendo con el tiempo desde la última exposición, aunque continuaba siendo significativo 20 meses después de haber finalizado las labores de limpieza. Estos mismos autores determinaron de nuevo la prevalencia

de síntomas respiratorios tras 5 años del vertido utilizando la misma metodología (Zock *et al.*, 2012). Llegaron a la conclusión de que la sintomatología respiratoria provocada como consecuencia de la participación en las tareas de limpieza del vertido se mantiene de 5 años después de la exposición.

### 1.2.3. Genotoxicidad y toxicidad endocrina

Hasta la fecha, estudios centrados en la evaluación de la genotoxicidad o la toxicidad endocrina relacionada con la exposición a vertidos de petróleo sólo se han realizado tras los accidentes del *Braer* y del *Prestige*, y se encuentran recogidos en la Tabla 4.

<b>TABLA 4:</b> Estudios epidemiológicos de genotoxicidad y toxicidad endocrina en poblaciones humanas expuestas a vertidos de petróleo (ordenados cronológicamente según el vertido)			
<b>Accidente– Referencia</b>	<b>Características del estudio</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados</b>
<i>Braer</i> – Cole <i>et al.</i> (1997)	Longitudinal. Genotoxicidad en residentes ( <i>N</i> =26) y controles ( <i>N</i> =9). Tres muestreos: después de 10 días, 10 semanas y 1 año del accidente	Aductos en el ADN en células mononucleadas y frecuencia de mutaciones <i>hprt</i> en linfocitos T	No hubo evidencia de genotoxicidad en ninguno de los parámetros evaluados
<i>Prestige</i> – Laffon <i>et al.</i> (2006)	Transversal. Genotoxicidad en individuos que realizaron autopsias y limpieza de aves petroleadas ( <i>N</i> =34) y controles ( <i>N</i> =35)	COV ambientales. Ensayo del cometa y test de MN. Polimorfismos en genes de reparación del ADN ( <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> , <i>APE1</i> )	Incremento significativo en el ensayo del cometa, pero no en test MN, relacionado con el tiempo de exposición. Individuos expuestos con alelos <i>XRCC1</i> -399Gln o <i>APE1</i> -148Glu mostraron incremento en el daño ADN
<i>Prestige</i> – Pérez-Cadahía <i>et al.</i> (2006)	Transversal. Genotoxicidad en voluntarios y trabajadores que participaron en la limpieza ( <i>N</i> =68) y controles ( <i>N</i> =42)	COV ambientales. Ensayo cometa, SCE, test de MN	Altos niveles de COV en los voluntarios. Incremento significativo en el ensayo del cometa en individuos expuestos. Influencia de sexo, edad y tabaco en la genotoxicidad. No hubo efecto protector de usar mascarilla.
<i>Prestige</i> – Pérez-Cadahía <i>et al.</i> (2007)	Transversal. Genotoxicidad y alteraciones endocrinas en voluntarios y trabajadores que participaron en la limpieza ( <i>N</i> =68) y controles ( <i>N</i> =42).	COV ambientales. Metales pesados en sangre (Al, Cd, Ni, Pb, Zn). SCE. Prolactina y cortisol. Polimorfismos en genes metabólicos ( <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTP1</i> )	Altos niveles de COV en el ambiente de los voluntarios. Incremento significativo en los niveles de Al, Ni y Pb, y descenso de Zn, en individuos expuestos. Incremento significativo en la tasa de SCE en expuestos, influenciada por edad, sexo, consumo de tabaco y genotipo <i>GSTM1</i> . Descenso significativo en los niveles de prolactina y cortisol en expuestos

TABLA 4: (Continuación)			
Accidente – Referencia	Características del estudio	Métodos	Resultados
<i>Prestige</i> – Pérez-Cadahía <i>et al.</i> (2008a)	Transversal. Genotoxicidad y alteraciones endocrinas en voluntarios y trabajadores que participaron en la limpieza (N=180) y controles (N= 60)	Metales pesados en sangre (Al, Cd, Ni, Pb, Zn). Ensayo del cometa. Prolactina y cortisol. Polimorfismos en genes metabólicos ( <i>CYP1A1</i> , <i>EPHX1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTP1</i> )	Incremento significativo en los niveles de Al, Ni y Pb, y descenso de Zn, en individuos expuestos. Incremento significativo en el ensayo del cometa y descenso en niveles de cortisol en individuos expuestos. Se relacionaron niveles más elevados de daño en el ADN con los alelos variantes de <i>CYP1A1</i> y <i>EPHX1</i> , y menor daño en el ADN con los genotipos nulos <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>
<i>Prestige</i> – Pérez-Cadahía <i>et al.</i> (2008b)	Transversal. Genotoxicidad en voluntarios y trabajadores que participaron en la limpieza (N=159) y controles (N=60)	Test de MN. Polimorfismos en genes metabólicos ( <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>EPHX1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTP1</i> ). Polimorfismos de genes de reparación de ADN ( <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> , <i>XPB</i> )	Incrementos generales en la frecuencia de MN y descensos en el índice de proliferación en individuos con largo tiempo de exposición. Todos los polimorfismos analizados, exceptuando <i>CYP1B1</i> y <i>XRCC1</i> , influyeron en los niveles de daño citogenético
<i>Prestige</i> – Pérez-Cadahía <i>et al.</i> (2008c)	Transversal. Relaciones entre concentraciones en sangre de metales pesados y parámetros citogenéticos y endocrinos en expuestos (N= 179)	Metales pesados en sangre (Al, Cd, Ni, Pb, Zn). Ensayo del cometa, SCE, test de MN. Prolactina y cortisol	El Pb se relacionó con el ensayo del cometa. El cortisol estuvo influenciado por Al y Ni de forma inversa y por Cd de forma directa. En mujeres hubo una fuerte asociación entre el Cd y la prolactina
<i>Prestige</i> – Rodríguez-Trigo <i>et al.</i> (2010)	Transversal, dos años después. Efectos respiratorios y daño cromosómico en expuestos (N= 501) y no expuestos (N= 177)	Síntomas respiratorios, espirometría, marcadores de estrés oxidativo e inflamación de vías aéreas. Lesiones cromosómicas y estructurales en linfocitos	La participación en las tareas de limpieza estuvo asociada a la persistencia de síntomas respiratorios, elevación de marcadores de daño en vías aéreas y daño cromosómico.
<i>Prestige</i> – Valdiglesias <i>et al.</i> (2012)	Transversal. Daño genotóxico y alteraciones en la reparación del ADN en ratas expuestas por inhalación a un fuel similar al del <i>Prestige</i>	Ensayo del cometa, test de MN. Ensayo de sensibilidad a mutágenos	La exposición por inhalación indujo daños en el ADN, especialmente en las ratas muestreadas 15 días después de la exposición, y alteraciones en la reparación del ADN

COV, compuestos orgánicos volátiles; MN, micronúcleos; SCE, intercambios entre cromátidas hermanas.

Cole *et al.* (1997) evaluaron la posible genotoxicidad como consecuencia del vertido del *Braer* en una población poco numerosa (26 expuestos vs. 9 controles), realizando tres muestreos a lo largo de un año. Usando muestras de sangre para detectar los aductos en el ADN y las mutaciones en el gen *hprt* no obtuvieron ninguna evidencia de genotoxicidad. Sin

embargo, no se especificaba que la población expuesta hubiera participado en las tareas de limpieza, sino solamente que eran residentes en el área de la catástrofe. Parece probable que la participación en las tareas de limpieza implicase una mayor exposición a los compuestos tóxicos del fuel que la experimentada por los habitantes de la zona que no participaron en la limpieza.

La mayoría de estudios centrados en el vertido del *Prestige* fueron realizados en nuestro laboratorio, algunos de ellos en colaboración con grupos de las otras dos Universidades gallegas (Santiago de Compostela y Vigo). En un primer trabajo en un pequeño grupo de individuos que participaron en la limpieza y autopsias de aves petroleadas (34 expuestos vs. 35 controles) se observó un incremento significativo y proporcional al tiempo de exposición del daño en el ADN, evaluado mediante el ensayo del cometa, pero no del daño citogenético (test de micronúcleos) (Laffon *et al.*, 2006).

Estos resultados pusieron de manifiesto la necesidad de realizar un estudio mayor, para lo cual se analizaron sujetos, tanto voluntarios como trabajadores contratados, que participaron en la limpieza de playas y rocas (180 expuestos vs. 60 controles). Inicialmente se aplicó el ensayo del cometa y los resultados obtenidos indicaron que la exposición ocasionó un incremento significativo de este tipo de daño en todos los grupos de individuos expuestos: voluntarios, trabajadores de recogida manual y trabajadores que utilizaron máquinas hidrolimpiadoras. Se utilizó este ensayo para realizar una primera evaluación por su gran sensibilidad y porque permite obtener resultados en un tiempo razonablemente breve. Con todo, esta técnica pone de manifiesto lesiones primarias en el ADN, a menudo fácilmente reparables. Por ello se consideró que era necesario completar el estudio de la genotoxicidad mediante la aplicación de tests citogenéticos, como el test de micronúcleos y el de intercambios entre cromátidas hermanas, ya que detectan lesiones fijadas en el material genético. Los resultados de estos análisis mostraron que los trabajadores expuestos al fuel durante períodos más prolongados (tres-cuatro meses), pero no los voluntarios expuestos durante únicamente cinco días, presentaban incrementos significativos en las tasas de daño citogenético y en los indicadores de citotoxicidad (Pérez-Cadahía *et al.* 2006, 2007, 2008a y 2008b).

Estos datos fueron apoyados posteriormente por un estudio de genotoxicidad realizado en ratas a las que se expuso por inhalación a un fuel similar al del *Prestige*, en el que

se comprobó que dicha exposición indujo daños en el ADN y citogenéticos, así como alteraciones en la capacidad de reparación del material hereditario (Valdiglesias *et al.*, 2012).

Además Rodríguez-Trigo *et al.* (2010), en un estudio que se realizó tomando muestras dos años después de la exposición al fuel, mostraron la persistencia de las alteraciones citogenéticas ya que describieron una mayor prevalencia de alteraciones cromosómicas en los marineros expuestos al fuel que en los controles.

Por otra parte, en los individuos expuestos al fuel del *Prestige* se observaron alteraciones en los niveles plasmáticos de prolactina y cortisol (Pérez-Cadahía *et al.*, 2007 y 2008a), hormonas relacionadas con procesos de estrés psicofisiológico (Sobrinho, 2003; Dahlgren *et al.*, 2005). También se describieron modificaciones significativas en parámetros inmunológicos, como los porcentajes de ciertas subpoblaciones linfocitarias y concentraciones de citoquinas circulantes, en personas que estuvieron en contacto con el fuel durante varios meses (Gestal *et al.*, 2004). En este último estudio se encontraron además cambios psicofisiológicos asociados a la exposición, de entre los cuales los más destacables fueron alteraciones del sueño, dolores de cabeza, mareos, sentimiento de tristeza y ansiedad.

## **2. BIOMARCADORES**

La biomonitorización humana tiene como objetivo evaluar la exposición a agentes ambientales que son capaces de inducir efectos adversos en la salud de los individuos expuestos. Se basa en la utilización de indicadores medibles de cambios en los sistemas biológicos asociados con la exposición a un tóxico, y su importancia radica en la identificación de las exposiciones potencialmente peligrosas antes de que sus efectos adversos se hagan patentes. Tras la captación de un agente externo (xenobiótico) y antes del desarrollo de una patología clínica ocurren una serie de eventos biológicos y moleculares. La medida de alguno de estos eventos intermedios puede proporcionar indicadores útiles y específicos. Dichos indicadores se denominan marcadores biológicos o biomarcadores, e indican cambios ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos en los sistemas biológicos, producidos por el propio agente, sus metabolitos o sus productos de reacción, que se miden en los tejidos o fluidos humanos como sangre, orina, pelo, uñas, tejido adiposo o dientes (IPCS, 1993; Knudsen y Merlo, 2012). De este modo se posibilita el establecimiento de los valores máximos tolerables de un determinado agente y su regulación ambiental y ocupacional. En este trabajo se han determinado biomarcadores de efecto genotóxico, inmunotóxico y de toxicidad endocrina.



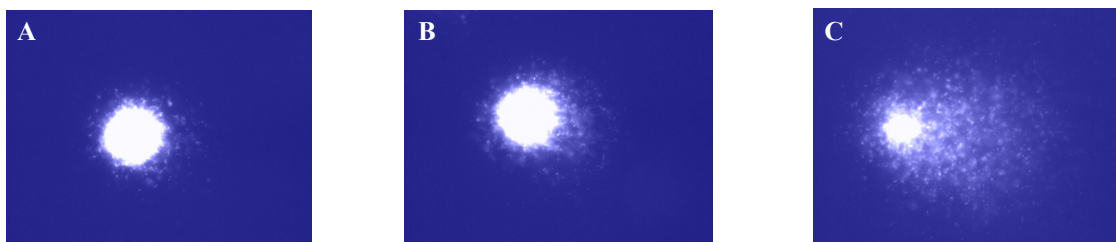
## 2.1. Biomarcadores de genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad de un agente físico, químico o biológico para dañar el material genético de un organismo, que puede derivar en el desarrollo de efectos biológicos adversos. Normalmente el daño no afectará sólo al ADN sino también a aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y el comportamiento del material hereditario.

En este trabajo se incluyen varios marcadores de daño genotóxico, como son la electroforesis en microgel de células aisladas o ensayo del cometa, el test de micronúcleos y el ensayo de mutación en el receptor de las células T.

### 2.1.1. Electroforesis en microgel de células aisladas (ensayo del cometa)

El ensayo de electroforesis en microgel de células aisladas, llamado comúnmente ensayo del cometa, es una técnica sencilla, rápida y sensible para el análisis y cuantificación del daño en el ADN de células individuales. Esta técnica mide roturas de cadena en el ADN permitiendo, de este modo, detectar los efectos genotóxicos inducidos por diferentes agentes físicos o químicos. Su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena de ADN presentes (Figura 3).



**FIGURA 3.** Imágenes de leucocitos tras la realización del ensayo del cometa: A) célula no dañada, B) célula con daño moderado, C) célula muy dañada.

La realización de este ensayo consiste en lisar las células, que se encuentran embebidas en un microgel de agarosa preparado sobre un portaobjetos, utilizando una solución con detergente, para permeabilizar las membranas, y una alta concentración de sales, para eliminar las proteínas nucleares. Así se consigue eliminar las membranas, el citoplasma y el nucleoplasma y se obtienen nucleoides. A continuación se incuban en medio neutro o alcalino para permitir la relajación de la estructura superenrollada del ADN. Como consecuencia de la carga negativa del ADN, los fragmentos rotos y las zonas relajadas de la cromatina migrarán

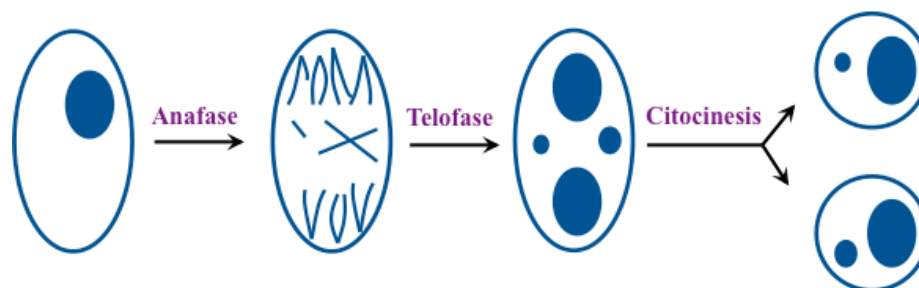
fuera del núcleo hacia el ánodo durante la electroforesis a través de los poros del gel. Lógicamente, debido a su tamaño los fragmentos más pequeños migrarán más que los grandes y por ello se genera una estructura con forma de cometa.

En esta técnica el pH utilizado durante los procesos de desenrollamiento y electroforesis es determinante, ya que permite analizar diferentes lesiones. A pH próximo a la neutralidad se facilita predominantemente la detección de roturas de cadena doble y la presencia de entrecruzamientos; a pH 12.1-12.4 se evalúan principalmente roturas de cadena doble, procesos incompletos de reparación por escisión y entrecruzamientos, y a pH superior a 12.6, además de todas las lesiones anteriores, los lugares sensibles al álcali (Kumaravel y Jha, 2006). Esto es debido a que a pH neutro el ADN permanecerá en forma de dúplex (Olive *et al.*, 1991). Con pH alcalino se facilita el desenrollamiento y la desnaturalización, por rotura de los puentes de hidrógeno que unen las dos hebras nucleotídicas, permitiendo la detección de roturas de cadena sencilla (Singh *et al.*, 1988) y haciendo la técnica más sensible al daño producido sobre el ADN por agentes genotóxicos, ya que este tipo de roturas se generan en mayor cantidad que las de cadena doble (Tice, 1995).

Esta metodología presenta las ventajas de posibilitar la obtención de datos a nivel de célula individual, lo que confiere al ensayo una mayor robustez estadística, que sólo se precisa un número reducido de células por muestra (<10000), y que se puede utilizar en cualquier tipo celular (Kumaravel y Jha, 2006).

### 2.1.2. Test de micronúcleos

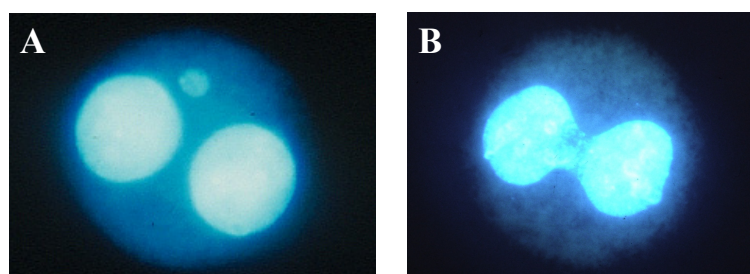
Los micronúcleos (MN) son pequeñas partículas presentes en el citoplasma que contienen fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros que no se unen correctamente al huso mitótico durante el proceso de segregación cromosómica en la anafase mitótica. Durante la telofase, cuando se reconstituye la membrana nuclear alrededor de los dos núcleos hijos, estos cromosomas o fragmentos de ellos no son incorporados al núcleo principal, sino que se encapsulan en una partícula nuclear separada y mucho más pequeña, que se ha llamado MN (Decordier *et al.*, 2011; Fenech *et al.*, 2011) (Figura 4). El origen de los MN está relacionado con mutaciones en proteínas cinetocóricas o del huso mitótico y con roturas en las cadenas de ADN generadas por la exposición a mutágenos ambientales y que no han podido ser reparadas (Fenech, 1993). Es por esto que la presencia de MN en el interior de las células constituye un biomarcador adecuado y sensible para evaluar el daño genético producido por la exposición a agentes genotóxicos.



**FIGURA 4.** Proceso de formación de micronúcleos (adaptada de Fenech *et al.*, 1999).

La formación de un MN puede ser indicio de daño causado por una exposición ocurrida mucho tiempo antes de la toma de la muestra (Maluf y Erdtman, 2000) y hoy se consideran biomarcadores no sólo de exposición ambiental a mutágenos y/o carcinógenos, sino también como marcadores de inestabilidad genómica (Iarmarcovai *et al.*, 2006). Recientemente se han propuesto también como marcadores de riesgo para el desarrollo de cáncer (Tucker y Preston 1996; Bonassi *et al.*, 2007). Además posee la ventaja de ser una técnica con un gran poder estadístico debido al elevado número de células que son evaluadas (1000-2000 células/individuo).

Para que se generen los MN es necesario que las células experimenten un proceso de división. El desarrollo del ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (Fenech y Morley, 1985) permite la identificación microscópica, por su aspecto binucleado, de aquellas células que se han dividido una sola vez después de la exposición (Figura 5), lo que supuso un incremento en la precisión de esta técnica con respecto al test de MN tradicional. El bloqueo se consigue mediante la utilización de citocalasina-B, sustancia que interfiere en la polimerización de la actina, proceso necesario para la correcta división del citoplasma pero que no interfiere en la división nuclear.



**FIGURA 5.** Imágenes de células binucleadas con un micronúcleo (A) y con un puente nucleoplásmico (B).

Al mismo tiempo que se realiza el ensayo para determinar los MN en células binucleadas se pueden evaluar otros parámetros indicativos de otro tipo de lesiones, como los

puentes nucleoplásmicos (NPB, de *nucleoplasmic bridges*) o las yemas nucleares (NBUD, de *nuclear buds*), y el índice de proliferación de células bloqueadas en citocinesis (CBPI, de *cytokinesis block proliferation index*), que nos ayuda a estimar si existen procesos de citotoxicidad por causa de la exposición.

En los últimos años se está extendiendo la utilización de una variante de este ensayo que cuantifica la frecuencia de MN mediante técnicas de citometría de flujo, que permiten el análisis de una gran cantidad de células en un tiempo muy pequeño. Para su realización se trata a las células con detergente, sales y el colorante fluorescente yoduro de propidio, con lo que se provoca la ruptura de la membrana plasmática liberando los núcleos y MN, cuyo material genético quedará teñido con fluorescencia. Los MN son entonces discriminados de los núcleos en la distribución de flujo en base a su tamaño y a la intensidad de su señal fluorescente.

### 2.1.3. Ensayo de mutación en el receptor de las células T

El receptor de las células T (TCR, de *T-cell receptor*) es un heterodímero formado por dos cadenas proteicas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que se expresa en la superficie celular de la gran mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los genes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR se localizan en los cromosomas 14 y 7 respectivamente, y son fenotípicamente hemicígotos, por lo que sólo uno de los dos alelos de cada gen se expresa activamente como resultado de un mecanismo de exclusión alélica similar al que se observa en los genes de las inmunoglobulinas de los linfocitos B. Por eso se espera que una única mutación en uno de los dos genes funcionales del TCR ocasione la no expresión fenotípica del TCR en la superficie celular (Kronenberg *et al.*, 1986). Además el TCR sólo puede expresarse en la superficie celular cuando forma un complejo con la proteína de superficie CD3. TCR y CD3 juegan un papel importante en el reconocimiento de antígenos y en la transducción de señales, por lo que la unión de los dos componentes es esencial para estas funciones (Clevers *et al.*, 1988). Si se inactiva la expresión de alguna de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  del TCR, el complejo TCR $\alpha\beta$ /CD3 no puede ser transportado a la superficie de la membrana celular y los complejos alterados se acumulan en el citoplasma (Akiyama *et al.*, 1995).

Las mutaciones en alguno de los alelos del TCR pueden detectarse por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos que reconozcan la molécula CD3. Esta técnica permite identificar y cuantificar los mutantes TCR $\alpha\beta$  en la población de linfocitos T colaboradores que expresan CD4 (Akiyama *et al.*, 1995). Se mide la frecuencia de células mutantes CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> entre las células T CD4<sup>+</sup> normales. Este método considera el total de las mutaciones en los

genes de las cadenas TCR, no diferenciando entre las de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ . Además el análisis requiere poco tiempo y sólo una pequeña cantidad de sangre fresca, ya que las frecuencias de mutación son del orden de  $10^{-4}$ . Complementariamente, los clones de células T mutantes pueden ser aislados y cultivados *in vitro* para analizar las mutaciones.

## 2.2. Biomarcadores de toxicidad endocrina: prolactina y cortisol

La complejidad del sistema endocrino es elevada debido a la gran cantidad de hormonas y glándulas que lo componen y están implicadas en su funcionamiento, y por todos los procesos fisiológicos que regula. Los fenómenos de toxicidad endocrina se encuentran íntimamente relacionados con los de inmunotoxicidad, debido fundamentalmente a que el sistema endocrino actúa regulando el sistema inmune. Un ejemplo sería la relación bidireccional que existe entre la hormona prolactina y el sistema inmune, estando éste también regulado por el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. En concreto, este eje resulta fundamental en la habilidad de los organismos vertebrados para responder ante el estrés y es una diana para los metales pesados (Lacroix y Hontela, 2004). Entre todos los tipos hormonales existentes, el cortisol y la prolactina tienen gran importancia en relación con procesos de estrés fisiológico asociados a exposiciones ambientales (Sobrinho, 2003; Dahlgren *et al.*, 2005).

La **prolactina** es una hormona proteica secretada inicialmente en forma de proproteína de 56.000Da por la adenohipófisis, que luego se transforma en hormona activa de 23.000Da. Su diana de acción son las células mamarias, siendo responsable de la iniciación y el mantenimiento de la lactancia. Durante la infancia los niveles plasmáticos de prolactina son muy bajos y aumentan en la pubertad, principalmente en mujeres. La secreción de esta hormona sigue ritmos circadianos y su nivel máximo coincide con las horas de sueño. También es secretada por la placenta, encontrándose en gran concentración en el líquido amniótico. Su secreción se ve influenciada por una gran cantidad de factores fisiológicos, ya que el sueño, el estrés, la hipoglucemia y el ejercicio físico incrementan su secreción.

La secreción de prolactina está regulada mediante dos procesos diferentes: en uno de ellos está implicado el hipotálamo, que la inhibe mediante el factor inhibidor de prolactina y dopamina y estimula su liberación a través del factor liberador de prolactina, serotonina, noradrenalina, etc.; y el otro mecanismo es a través de la autorregulación, ya que la prolactina liberada activa las neuronas dopaminérgicas que liberan dopamina, que a su vez inhibe la acción de las células secretoras de prolactina (Flórez, 1992). Además se ha detectado que su

tasa de secreción se relaciona inversamente con los metales pesados cadmio, plomo y níquel (Gerhard *et al.*, 1998).

El **cortisol** es la una hormona esteroidea producida en la corteza suprarrenal a partir del colesterol. Su secreción también sigue ciclos y es menor a las últimas horas de la tarde y primeras de la noche y máxima sobre las 8 de la mañana; la secreción media diaria de un adulto es de 14 a 20 mg/día. Su secreción se autorregula por retroalimentación, ya que el mismo cortisol inhibe su producción en las células corticotrofas de la hipófisis. Además su secreción está ligada a distintos factores como el estrés psicológico, el esfuerzo físico, la hipertermia, la hipoglucemia, la hipotensión, etc., que incrementarían su secreción.

La actividad del cortisol es principalmente glucocorticoide (almacenamiento de glucógeno hepático y actividad antiinflamatoria), y además es el producto final del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal en respuesta a diferentes tipos de estrés (Teles *et al.*, 2005). Tanto los HAP como los metales pesados tienen la capacidad de alterar los niveles hormonales de cortisol. La secreción de esta hormona se ve influenciada por la exposición agudas y crónica *in vivo* a cadmio, que produce acumulación en los órganos renales y efectos tóxicos en las células adrenocorticales (Lacroix y Hontela, 2004).

### **2.3. Biomarcadores de inmunotoxicidad**

Se define inmunotoxicidad como el cambio adverso o inapropiado de la estructura y función del sistema inmunológico causado por la exposición a un agente tóxico. Los efectos adversos pueden manifestarse como inmunodepresión (descenso de la respuesta inmune), inmunoestimulación (aumento de la respuesta inmune), hipersensibilidad (respuesta exagerada o inapropiada del sistema inmunológico al agente extraño) o autoinmunidad (los componentes del sistema inmunológico reaccionan contra los antígenos propios produciendo lesiones tisulares y patologías). Los mecanismos por los que se producen estos efectos son bastante desconocidos y se ha visto que los factores predisponentes del individuo tienen gran importancia (Descotes, 2004; Klaassen y Walkins III, 2005).

Como biomarcadores de inmunotoxicidad se utilizan de forma habitual las alteraciones en los porcentajes de diferentes subpoblaciones linfocitarias, los niveles de citoquinas circulantes en sangre, y las concentraciones de neopterina y parámetros relacionados con la degradación del triptófano. Los dos primeros tipos de biomarcadores reflejan el tipo de

respuesta inmune que se desencadena como consecuencia de la exposición, mientras que los últimos proporcionan información acerca del grado de activación general del sistema inmune.

### 2.3.1. Subpoblaciones linfocitarias

Los linfocitos son las células más importantes implicadas en la inmunidad adquirida y constituyen entre el 20 y el 40% de las células de la sangre en el ser humano. Son células muy especializadas que interactúan con otras células para iniciar una respuesta inmune. Los dos tipos principales de linfocitos son los B y los T, los cuales a su vez pueden dividirse en distintas subpoblaciones, en base a los receptores de superficie que expresan y las funciones que realizan. La especificidad de receptor y la heterogeneidad funcional permite a las subpoblaciones linfocitarias responder ante prácticamente cualquier antígeno (Descotes, 2004; Tryphonas *et al.*, 2005).

Los linfocitos B son precursores de las células plasmáticas que producen los anticuerpos. Derivan de células madre hematopoyéticas que se encuentran en el hígado en el feto y en la médula ósea en los otros estadios del desarrollo, y constituyen entre el 10 y el 20% de los linfocitos de la sangre periférica en humanos. Pueden identificarse por la presencia de inmunoglobulinas de superficie IgM, IgD, IgG, IgA o IgE y varios marcadores de diferenciación celular incluyendo CD19, CD22, CD23 y CD37. Los linfocitos B se activan directamente como consecuencia de la unión de las inmunoglobulinas, expresadas en la superficie celular, a un antígeno, o indirectamente por interacción de los linfocitos T (Descotes, 2004; Tryphonas *et al.*, 2005).

Los linfocitos T constituyen entre el 50 y el 70% de los linfocitos de la sangre periférica en el ser humano y expresan el receptor de superficie TCR, además de los marcadores de diferenciación celular CD2 y CD3. Este tipo de linfocitos suele dividirse en dos subpoblaciones, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, diferenciadas por su función y marcador de superficie. Los linfocitos T colaboradores (Th, de *helper*) expresan en su superficie el marcador CD4 y su función principal es proporcionar asistencia a los linfocitos B, mediante la liberación de citoquinas, fundamentalmente ayudándoles a producir anticuerpos en respuesta a un ataque antigénico. Este tipo de linfocitos, a su vez, se divide en dos subtipos Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, que difieren en el perfil de citoquinas que secretan. El subtipo Th<sub>1</sub> secreta principalmente interleuquina 2 (IL2) e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), e induce respuestas celulares que aumentan la actividad microbicida. El subtipo Th<sub>2</sub> secreta IL4, IL5 e IL10, que estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos (Descotes, 2004; Tryphonas *et al.*, 2005). Los linfocitos T citotóxicos (Tc) expresan en sus

superficie el marcador CD8, y su función consiste en capturar a la célula diana mediante mecanismos de adhesión y liberar el contenido de sus gránulos hacia esta célula. Esto induce apoptosis o desestructuración de la membrana y la muerte de la célula diana (Abbas y Lichtman, 2004).

Las principales células implicadas en las respuestas inmunes de tipo inespecífico son las células *natural killer* (NK) y varias células fagocíticas. Las células NK están directamente relacionadas con los linfocitos T pero carecen de los receptores de superficie que tienen éstos. Expresan CD16 y CD56 como marcadores de superficie (Tryphonas *et al.*, 2005). El papel principal de estas células es el de eliminar directamente a las células diana mediante la liberación de mediadores citotóxicos. Las células NK son capaces de reconocer y destruir tanto a células que están cubiertas con IgG – citotoxicidad dependiente de anticuerpo – como a células que expresan niveles de antígenos del sistema principal de histocompatibilidad (HLA) más bajos de lo normal (Descotes, 2004).

La importancia de evaluar las alteraciones en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones linfocitarias radica en la existencia de diferentes estudios que relacionan la exposición a determinados agentes con capacidad inmunotóxica con estas alteraciones y sus consecuencias sobre la respuesta inmune (Boscolo *et al.*, 1999; Biró *et al.*, 2002; Tulinska *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005). La técnica más utilizada para determinar las subpoblaciones linfocitarias, por ser rápida y sencilla, consiste en la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los receptores de superficie expresados por cada subtipo celular, y su análisis mediante citometría de flujo.

### 2.3.2. Citoquinas

Para mantener las funciones y la homeostasis óptima del organismo, es fundamental que todas las células del sistema inmunológico se comuniquen y respondan de una manera coordinada. La integración de las funciones del sistema inmunológico se lleva a cabo mediante la comunicación célula a célula a través de pequeñas moléculas proteicas llamadas citoquinas. Cada célula del sistema inmune tiene la capacidad de sintetizar y liberar una variedad de citoquinas que viajan hasta otras células, a las que estimulan para que se vuelvan más o menos activas. Las citoquinas constituyen un gran grupo de moléculas que incluyen las interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF, de *tumour necrosis factors*), factores transformantes de crecimiento (TGF, de *transforming growth factors*) y varios factores estimuladores de colonias (CSF, de *colony stimulating factors*). Las citoquinas no son



producidas exclusivamente por las células del sistema inmunológico, sino que otros tipos de células de otros sistemas del organismo también pueden sintetizarlas bajo determinadas circunstancias (fibroblastos, células endoteliales, plaquetas, condrocitos, hepatocitos, etc.). Cualquier alteración en la función o el número de células productoras de citoquinas resultaría en una producción anómala de estas moléculas y una pérdida del control regulador. Por lo tanto, cualquier alteración puede estar directamente asociada con el sistema inmune o indirectamente a través de otros sistemas (Tryphonas *et al.*, 2005).

Las IL son liberadas fundamentalmente por los linfocitos T, y hay unos 30 tipos, de las cuales las más destacadas son (Descotes, 2004):

- IL2: se produce casi exclusivamente por los linfocitos T cuando son activados por antígenos o señales co-estimuladoras. La IL2 aumenta la expresión de sus propios receptores de alta afinidad (IL2R) en otros linfocitos T, los cuales liberan sucesivamente varias citoquinas que activan células inmunocompetentes. El efecto proliferativo de la IL2 es crucial porque produce grandes cantidades de células activadas a partir de linfocitos T específicos de antígenos poco frecuentes. La IL2 es un factor esencial en la magnitud de las respuestas de células T y NK, la inducción de la producción de IFN $\gamma$  y la activación de linfocitos B y macrófagos.
- IL4: es producida principalmente por los linfocitos CD4<sup>+</sup>Th2, pero también por los basófilos y eosinófilos. La IL4 promueve las respuestas alérgicas e inhibe la inmunidad celular.
- IL6: la producen principalmente los monocitos y macrófagos, pero también los linfocitos B y T, los queratinocitos, las células endoteliales y otros muchos tipos de células. La producción de IL6 se desencadena por una variedad de estímulos como TNF $\alpha$ , IL1 e IL2. La IL6 está implicada en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y en la activación y diferenciación de los linfocitos T. La IL6 tiene unas propiedades antiinflamatorias muy marcadas y se cree que es el inductor más importante en la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos. Además, la IL6 ejerce efectos antiinflamatorios inhibiendo la producción de IL1 y de TNF $\alpha$ .
- IL-10: es un potente antiinflamatorio e inmunosupresor producido por muchos tipos celulares incluyendo monocitos, linfocitos B, linfocitos T, mastocitos y queratinocitos (Moore *et al.*, 2001). Inhibe la síntesis de muchas quimioquinas y citoquinas. Además, la IL10 estimula los linfocitos B y la secreción de anticuerpos. Niveles elevados de IL10 se

asocian con un descenso en la resistencia a infecciones debido a la inhibición de respuestas inflamatorias inducidas por patógenos microbianos.

- IFN $\gamma$ : los IFN incluyen tres familias identificadas inicialmente por su actividad antiviral. El IFN $\alpha$  y el IFN $\beta$  poseen actividad antiviral significativa, mientras que el IFN $\gamma$  ejerce principalmente actividades inmunomoduladoras. El IFN $\gamma$  es la citoquina más importante en la inmunidad celular. Es producido por los linfocitos T y las células NK y aumenta la presentación de antígenos y la producción de citoquinas por los monocitos, promoviendo la muerte de los patógenos microbianos. Estimula las células NK y los neutrófilos, incrementa la expresión de las moléculas constitutivas HLA de clase I, e induce la expresión de las moléculas HLA de clase II en células que normalmente no las producen. Promueve las respuestas Th2 y también es inhibidor de las respuestas alérgicas (Th1) mediadas por IL4.
- TNF $\alpha$ : es producido por monocitos, macrófagos, linfocitos activados, células NK, células endoteliales y mastocitos. El TNF $\alpha$  induce actividad antitumoral mediante un efecto citotóxico directo y por estimulación de respuestas inmunes antitumorales. Interactúa con células endoteliales para producir moléculas de adhesión que facilitan la migración de los fagocitos a los focos de inflamación. También es un potente activador de las funciones de los neutrófilos.

Debido a su papel ubicuo en la regulación de la inmunidad, inflamación y defensa natural del organismo, la evaluación de los niveles de citoquinas circulantes proporciona una de las medidas más importantes de la respuesta inmune humana y de los estados patológicos. Las citoquinas sirven principalmente como mediadores locales de la inmunidad y la inflamación; de esta manera, la detección de niveles alterados de determinadas citoquinas en la circulación evidenciaría una inmunopatología (Massaro, 1997). La concentración de citoquinas circulantes puede evaluarse de forma sencilla y simultánea mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos.

### 2.3.3. Neopterin

La neopterin es un compuesto pirimidínico derivado del trifosfato de guanosina (GTP, de *guanosine triphosphate*). Su biosíntesis comienza con la conversión de GTP en trifosfato de 7,8-dihidroneopterin mediante la enzima GTP ciclohidrolasa I (GTPCH). Debido a una deficiencia relativa de la piruvil-tetrahydropterina sintetasa (PTPS), la enzima necesaria para la

conversión del trifosfato de 7,8-dihidroneopterina en 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, los monocitos/macrófagos humanos estimulados por IFN $\gamma$  producen y liberan cantidades incrementadas de neopterina a expensas de los derivados de la biopterina (Huber *et al.*, 1983, 1984; Nathan, 1986) (Figura 6).

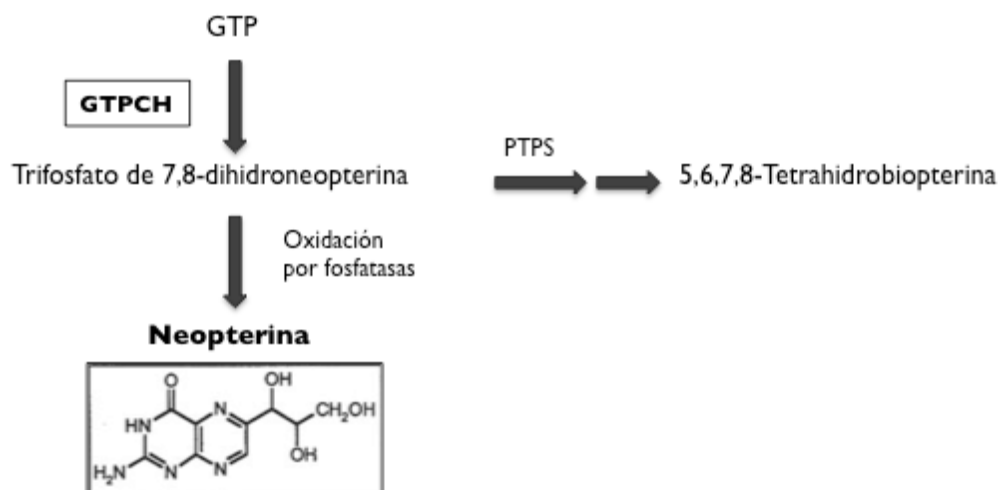


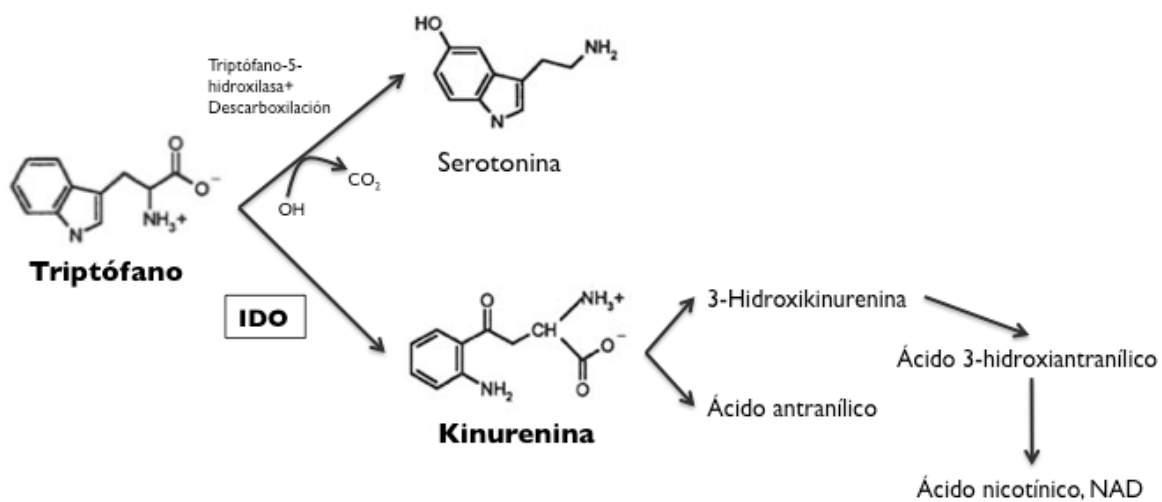
FIGURA 6. Ruta de síntesis de la neopterina.

Se han observado incrementos en los niveles de neopterina en los fluidos corporales humanos en varias condiciones patológicas que provocan una activación del sistema inmune celular, tales como infecciones virales o bacterianas, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, rechazo de trasplantes, enfermedades neurológicas y cardiovasculares, e incluso varios procesos malignos (Asci *et al.*, 2010). Por ello, la medida de la concentración de neopterina permite monitorizar de forma sensible el grado de activación del sistema inmune. La función específica de la neopterina no se conoce, pero se sabe que es capaz de amplificar la actividad de las especies reactivas de oxígeno, por lo que podría ser muy importante en la reacción de defensa de los monocitos/macrófagos activados mediante la amplificación de su potencial prooxidante (Widner *et al.*, 2002). Además se ha visto que la neopterina puede interferir con las rutas de señalización intracelulares sensibles al estrés oxidativo (Murr *et al.*, 2002).

La concentración de neopterina se evalúa normalmente en el suero o plasma sanguíneo, y las técnicas utilizadas para su determinación incluyen cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, de *high-performance liquid chromatography*), radioinmunoanálisis (RIA), o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Hamerlinck, 1999).

### 2.3.4. Metabolismo del triptófano

El triptófano es uno de los aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas y es el precursor de importantes compuestos biológicos como la serotonina, el ácido nicotínico y la vitamina niacina (Winder *et al.*, 2002). El sistema inmune puede activar la degradación del triptófano como mecanismo de defensa. Bajo determinadas circunstancias, se produce la secreción de IFN $\gamma$  por las células T, que es un potente estímulo para la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual cataliza la transformación del triptófano en *N*-formilkinurenina, que posteriormente será desformilada a kinurenina (Taylor y Feng, 1991) (Figura 7).



**FIGURA 7.** Rutas de producción de serotonina y ácido nicotínico a partir del triptófano.

Este proceso actúa como un mecanismo antimicrobiano o antitumoral y limita el crecimiento de patógenos intracelulares o células malignas, gracias a que disminuye la cantidad de triptófano disponible para la síntesis proteica (Schröcksnadel *et al.*, 2006). También se ha visto que la activación de la enzima IDO suprime la proliferación de las células T, de forma que sería un bucle de retroalimentación negativa del IFN $\gamma$  y una manera de regular la activación del sistema inmune (Schröcksnadel *et al.*, 2010). Por lo tanto, cuando se producen respuestas inmunes de tipo celular (Th1) se puede detectar un descenso en la concentración de triptófano y, consecuentemente, un aumento en la concentración de kinurenina en suero o plasma, que puede ser utilizado como biomarcador de efecto de la exposición a sustancias tóxicas sobre el sistema inmune. También se utiliza como biomarcador de inmunotoxicidad el grado de activación de la enzima IDO, medido mediante la relación entre las concentraciones de kinurenina y triptófano (Kin/Trp). Las concentraciones de triptófano y kinurenina se evalúan habitualmente en suero o plasma sanguíneo mediante determinación directa y simultánea por HPLC.

En conclusión, a la vista de que las personas expuestas al fuel del *Prestige* presentaron alteraciones genotóxicas, endocrinas e inmunotóxicas en el momento de la exposición y, al menos en cuanto a la genotoxicidad, dos años después de ésta, consideramos de crucial importancia realizar un nuevo estudio en esa población a fin de determinar la posible persistencia de dichas alteraciones siete años después de la exposición inicial.



# *Objetivos*

---





**OBJETIVOS**

El objetivo principal planteado en el presente estudio fue la determinación de la persistencia tras siete años de las alteraciones genotóxicas, hormonales e inmunotóxicas en las personas que estuvieron en contacto con el fuel del *Prestige* durante varios meses como consecuencia de su participación en las labores de limpieza. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los niveles de genotoxicidad en los individuos expuestos al fuel del *Prestige* siete años después de la exposición, mediante la determinación de los niveles de daño primario en el ADN, mutagenicidad y daño citogenético.
2. Analizar las posibles alteraciones endocrinas en esta población, mediante la evaluación de los niveles de las hormonas prolactina y cortisol.
3. Estudiar las posibles modificaciones en parámetros inmunológicos en estos individuos, incluyendo subpoblaciones linfocitarias, citoquinas circulantes, neopterina y sustancias del metabolismo del triptófano.
4. Determinar la influencia de factores fisiológicos, hábitos de consumo y utilización de medidas de protección durante las tareas de limpieza sobre los biomarcadores analizados.



# *Material y Métodos*

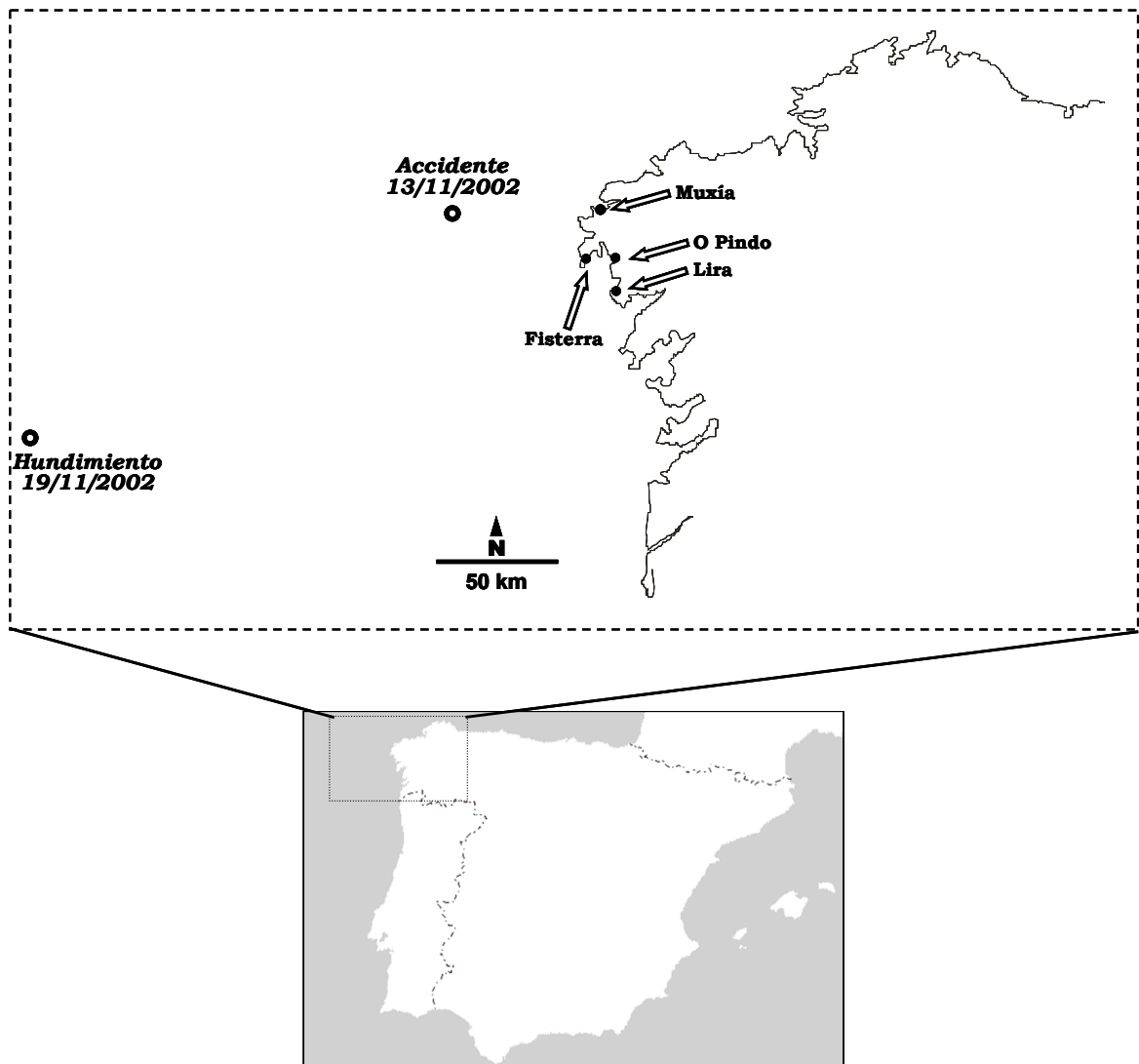
---



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

En este trabajo se analizó a un grupo de 54 individuos que estuvieron expuestos al fuel vertido por el buque *Prestige* durante un mínimo de 2 meses, como consecuencia de su participación en las labores de limpieza del litoral afectado entre noviembre de 2002 y octubre de 2003. Se incluyó a pescadores y mariscadores procedentes de cuatro localidades intensamente afectadas por el vertido, con los que se contactó a través de las respectivas cofradías: Fisterra ( $N=17$ ), Muxía ( $N=17$ ), Lira ( $N=8$ ) y O Pindo ( $N=12$ ) (Figura 8).



**FIGURA 8:** Mapa de la costa gallega mostrando la situación de las localidades de muestreo y los lugares del accidente inicial del *Prestige* y su hundimiento.

Asimismo se analizó un grupo control compuesto de 50 personas no expuestas a ninguna sustancia tóxica conocida en sus lugares de trabajo. Eran trabajadores de la Universidad, procedentes de centros donde no se realiza trabajo de laboratorio, y profesores de centros educativos. De todos los individuos se recogieron datos acerca de sus características demográficas, factores de estilo de vida, estado de salud general, hábitos de consumo e historia ocupacional por medio de un cuestionario, que se recoge en el Anexo. Los sujetos expuestos proporcionaron además información sobre las características de la exposición (tareas realizadas, utilización de medidas de protección, tiempo de exposición, etc.) y sobre ciertos síntomas generales de salud que pudiesen estar relacionados con la exposición, incluyendo síntomas respiratorios, dermatológicos y psico-neurológicos experimentados desde la exposición. Este estudio se realizó de acuerdo con los estándares éticos establecidos en la declaración de Helsinki de 1964. Todas las personas participantes fueron debidamente informadas de los objetivos y motivación del estudio y firmaron un consentimiento.

## **2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

La toma de muestras se realizó entre noviembre de 2009 y febrero de 2010. De cada individuo se obtuvieron muestras de sangre periférica por venipunción, siempre por la mañana temprano (entre las 8 y las 10am), antes del inicio de su jornada laboral, para evitar las variaciones circadianas. Las muestras se recogieron en dos tipos diferentes de tubos: los tubos de extracción Vacutainer® con heparina de litio, con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o sin anticoagulante, y los tubos BD Vacutainer® CPT™ (*Cell Preparation Tube*) con heparina de sodio. La sangre con heparina de litio se utilizó en fresco para el ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis, y la de los tubos con EDTA para el análisis en fresco de las subpoblaciones linfocitarias y el plasma sobrenadante, alicuotado y conservado a -80°C, para la determinación de citoquinas circulantes. El suero obtenido de los tubos sin anticoagulante se alicuotó y almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización para la evaluación de las hormonas, la neopterina, y las sustancias relacionadas con el metabolismo del triptófano. Las muestras recogidas en los tubos CPT™ se utilizaron para el aislamiento de los leucocitos mononucleares, como se describe a continuación, que a su vez se usaron en fresco para el ensayo de mutación en TCR y la evaluación de MN mediante citometría de flujo, y tras criopreservación para el ensayo del cometa.

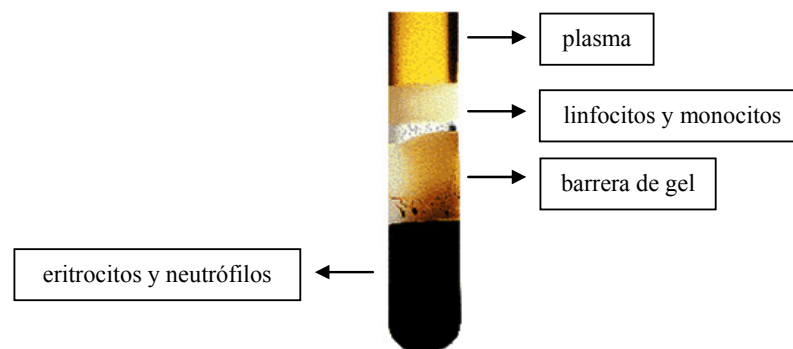
Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta la llegada al laboratorio, tiempo en todo caso inferior a 4h. Todas las muestras fueron codificadas en el momento de su obtención para asegurar la realización de un estudio ciego.

### 3. GENOTOXICIDAD

#### 3.1 Ensayo del cometa

##### 3.1.1. Aislamiento y conservación de leucocitos

El aislamiento de la fracción sanguínea correspondiente a los leucocitos mononucleares (linfocitos más monocitos) se llevó a cabo mediante los tubos BD Vacutainer® CPT™. Éstos contienen en su interior una disolución que crea un gradiente de densidad, junto con una barrera de gel que permite la separación de las distintas fracciones sanguíneas tras realizar una centrifugación a 3100rpm durante 30min en una centrífuga de rotor basculante (Figura 9).



**FIGURA 9:** Separación de los componentes sanguíneos en un tubo BD Vacutainer® CPT™.

Tras la centrifugación, la fracción de leucocitos mononucleares, junto con el plasma sanguíneo, queda aislada del resto de componentes celulares en la parte superior de la barrera de gel, con lo que sólo es necesario decantarla a unos tubos nuevos. En estos tubos se añadió PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma) pH 7.4 hasta alcanzar un volumen final de 10ml y se centrifugaron a 1500rpm durante 10min. A continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendió de nuevo el botón celular en 10ml de PBS. La suspensión celular se dividió en tres fracciones, una de 4ml para llevar a cabo el ensayo del cometa, otra de 3.5ml para el ensayo de mutación en TCR, y una tercera de 2.5 ml para la evaluación de MN por citometría de flujo.

El botón celular de la primera fracción se resuspendió en medio de congelación constituido por 40% de RPMI 1640, 50% de suero bovino fetal (FBS) y 10% de DMSO. Así los leucocitos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en fracciones de  $500\mu\text{l}$  a una concentración de aproximadamente  $10^7$  células/ml hasta el momento del análisis, tiempo en todo caso inferior a 2 meses. Para minimizar todo lo posible el daño celular durante el proceso de congelación,

éste fue realizado en un contenedor que garantiza el descenso gradual de la temperatura de 1°C por minuto (NALGENE® Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene Nunc International).

### 3.1.2. Estándar interno

Para evitar la variabilidad en los resultados por causa de las diferencias entre ensayos se utilizó un control interno en cada uno de los experimentos, siguiendo el protocolo descrito por Cebulka-Wasilewska (2003). Las muestras de dicho control se obtuvieron en una única toma a partir de un individuo varón joven. La sangre se recogió en tubos BD Vacutainer® CPT™ y el aislamiento, alicuotado y congelación de los leucocitos se realizó según lo descrito en el apartado anterior.

### 3.1.3. Preparación de los microgeles y lisis

A la hora de realizar el ensayo se descongelaron rápidamente las alícuotas de leucocitos en un baño a 37°C. Una vez a temperatura ambiente se añadió medio de descongelación a cada una de las alícuotas, compuesto por 4ml de RPMI 1640, 5ml de FBS y 1g de dextrosa. Se centrifugaron a 1500rpm durante 10min y se resuspendieron en RPMI 1640 para evaluar la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión del colorante azul de tripán, resultando en todos los casos superior al 85%. Las células fueron centrifugadas 3min a 9000rpm, resuspendidas en 100µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% en PBS y depositadas en dos gotas sobre portaobjetos previamente cubiertos con una primera capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% en agua destilada y deshidratados por calentamiento a 65°C durante 15min. Sobre cada gota se depositó un cubreobjetos y se colocaron sobre hielo 10min. Una vez solidificada la agarosa con las células, se retiraron los cubreobjetos y se procedió a la lisis de las células. Para ello, los portaobjetos se sumergieron en una disolución de lisis de pH 10 compuesta por NaCl 2.5M, Na<sub>2</sub>EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM, NaOH 250mM y Triton X-100 1%, añadido este último en el momento de su utilización. La lisis se realizó durante 1h en oscuridad a 4°C. Todos los pasos posteriores se realizaron en oscuridad para evitar daños adicionales sobre el ADN.

### 3.1.4. Electroforesis, neutralización y tinción

Tras la lisis, los portaobjetos se sumergieron en una disolución alcalina (pH>13) en un tanque de electroforesis colocado sobre hielo, a fin de permitir el desenrollamiento de la hélice de ADN y la expresión de los sitios sensibles al álcali. La disolución alcalina estuvo compuesta por Na<sub>2</sub>EDTA 1mM y NaOH 300mM. Tras 40min de incubación se inició el proceso



de electroforesis de 30min de duración a 300mA y 25V (0.83V/cm). A continuación se procedió a la neutralización de las muestras mediante 3 lavados de 5min cada uno con una disolución de pH 7.5 elaborada con Tris-HCl 0.4M. Por último, se tiñeron los portaobjetos con 60µl del colorante fluorescente 4.6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5µg/ml.

### 3.1.5 Captura y análisis de las imágenes

La captura y el análisis de las imágenes fue realizada mediante el programa Comet IV (Perceptive Instruments). Se tomó como parámetro para determinar el daño en el ADN el porcentaje de ADN en la cola del cometa (%TDNA), medido éste desde el centro estimado de la célula. Se analizaron un total de 100 células por individuo, procediendo 50 de cada una de las réplicas.

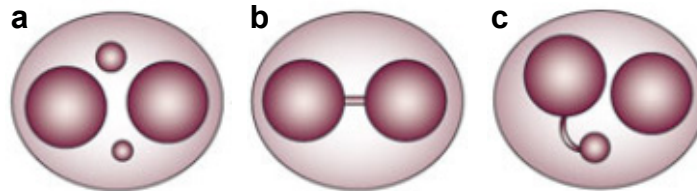
## 3.2. Test de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis

Los cultivos se establecieron por duplicado añadiendo 0.5ml de sangre a 4.5ml de medio de cultivo estéril. La composición del medio fue la siguiente: RPMI 1640 suplementado con 15% suero bovino fetal inactivado por calor, 1% fitohemaglutinina, 1% L-glutamina (200mM) y 1% solución de penicilina (5000U/ml)/estreptomicina (5000µg/ml). Estos cultivos se mantuvieron a 37°C durante 44h. A continuación se les añadieron 10µl de citocalasina-B a una concentración final de 6µg/ml, para conseguir inhibir la citocinesis. Se realizó la incubación durante un total de 64 horas a fin de obtener un mayor porcentaje de células binucleadas.

Para obtener las células, se centrifugaron los cultivos 10min a 800rpm. Se eliminó el sobrenadante y se sometieron a un choque hipotónico suave con KCl 0.075M a 4°C, con el fin de lisar los eritrocitos dejando intactas las membranas celulares de los linfocitos, y se volvieron a centrifugar. Se eliminó el sobrenadante nuevamente y se procedió a fijar las células añadiendo 4ml de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1), y 3 gotas de formaldehído, para mejorar la fijación. A continuación se volvieron a centrifugar y se retiró el sobrenadante. Se realizaron sucesivos lavados con Carnoy hasta el que botón celular quedó limpio. Para asegurar la fijación completa de los cultivos se dejaron durante al menos 18h a 4°C. Tras una nueva centrifugación, el botón celular se resuspendió en un pequeño volumen de Carnoy y se procedió a la extensión en un portaobjetos de 30µl de suspensión celular con cuidado y a muy poca altura, para evitar dañar las membranas celulares.

Los portaobjetos se tiñeron con el colorante fluorescente DAPI 5µg/ml. El análisis microscópico se realizó con un microscopio Leica DM-RXA, equipado con una lámpara de

mercurio de 100W. Se contaron un total de 2000 células binucleadas por individuo (1000 de cada réplica), evaluando el número total de células binucleadas con MN (BNMN), de células mononucleadas con MN (MNMN), de puentes nucleoplásmicos (NPB, de *nucleoplasmic bridges*) y de yemas nucleares (NBUD, de *nuclear buds*) presentes (Figura 10).



**FIGURA 10:** Representación de una célula binucleada con dos micronúcleos (a), un puente nucleoplásmico (b) y una yema nuclear (c) (adaptada de Fenech, 2007).

Para la identificación de células binucleadas bloqueadas en citocinesis, de MN, de NPB y de NBUD se siguieron los criterios de Fenech *et al.* (2003), según los cuales las primeras deben de cumplir las premisas siguientes:

- Las células deben tener dos núcleos de aproximadamente el mismo tamaño, patrón de tinción e intensidad.
- Los dos núcleos deben tener intactas las membranas y estar situadas en un mismo citoplasma.
- Los dos núcleos pueden estar unidos por un fino puente nucleoplásmico que no sea más ancho que una cuarta parte del diámetro nuclear.
- Los dos núcleos principales pueden tocarse pero no deben solaparse. Las células con dos núcleos solapantes pueden ser contadas únicamente si los límites nucleares permanecen distinguibles.
- La membrana de la célula binucleada debe estar intacta y ser claramente distinguible del límite citoplasmático de las células adyacentes.

Los MN cumplirán las siguientes características:

- El diámetro de los MN en linfocitos humanos generalmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio del núcleo principal, que corresponde a 1/256 y 1/9 del área de uno de los núcleos principales en una célula binucleada.
- Los MN han de ser redondos u ovalados.
- No deben estar unidos o conectados al núcleo principal.

- Los MN pueden tocar pero no solaparse con el núcleo principal y sus límites deben ser distinguibles de los de éste.
- Deben presentar siempre la misma intensidad de tinción que el núcleo principal aunque ocasionalmente puede ser más intensa.

Para la determinación de los NPB se tendrá en cuenta que:

- Los NPB son uniones continuas entre los núcleos de una célula binucleada.
- La anchura de los puentes puede variar, pero no suele exceder de una cuarta parte del diámetro del núcleo.
- La tinción de los NPB debe presentar las mismas características que la del núcleo principal.
- Rara vez se observará más de un puente en una célula binucleada.
- Es posible que una célula binucleada con un NPB contenga uno o más MN.

Y los criterios de identificación de los NBUD son los siguientes:

- Los NBUD son similares a los MN en apariencia, pero están conectados con uno de los dos núcleos principales a través de un puente un poco más estrecho que el diámetro del NBUD.
- Los NBUD tienen por lo general la misma intensidad de tinción que los MN.
- Ocasionalmente, puede parecer que el NBUD esté localizado en el interior de una vacuola adyacente al núcleo.

Además, se analizó el número de células con uno, dos, tres o cuatro núcleos en un total de 500 (250 de cada réplica), y con estos datos se calculó el índice de proliferación de células bloqueadas (CBPI, de *cytokinesis blocked proliferation index*), según la fórmula propuesta por Surrallés *et al.* (1995):  $CBPI = [MI + 2MII + 3(MIII + MIV)] / N$ , en la que MI a MIV representan el número de células con uno a cuatro núcleos, y N es el número total de células contadas:

### **3.3. Evaluación de micronúcleos por citometría de flujo**

La evaluación de la frecuencia de MN por citometría de flujo se llevó a cabo a partir los leucocitos mononucleares aislados de la sangre completa según se describió en el apartado 3.1.1. Se siguieron los protocolos descritos por Nüsse *et al.* (1994) y Roman *et al.* (1998), con pequeñas modificaciones. Las células se sometieron a una centrifugación a 1200rpm durante 6 min. El botón celular se resuspendió en 1ml de disolución fría, a 4°C, compuesta por NaCl

10mM, citrato sódico 1g/l, Nonidet P40 0.3ml/l, yoduro de propidio (PI) 50mg/ml y ARNsA A 0.1mg/ml, y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. A continuación se añadió el mismo volumen de una segunda disolución compuesta por ácido cítrico 1.5mg/l y sacarosa 0.25M, y se incubó durante 30min más en las mismas condiciones. Con esto se obtiene una suspensión de núcleos y MN que, al estar teñidos con PI que permite analizar el contenido de ADN, pudieron ser diferenciados en relación a su tamaño (canal FSC) e intensidad de señal fluorescente (canal FL2, en el que se detecta el PI) en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson), y cuantificados mediante el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson). Cada muestra se analizó por duplicado, adquiriendo un mínimo de 50.000 eventos.

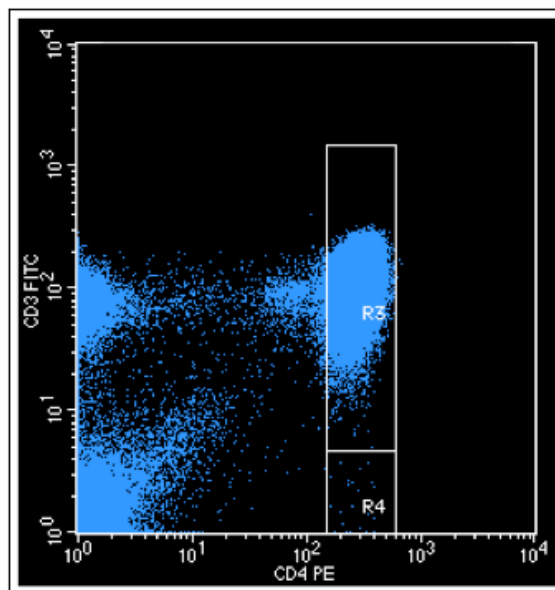
### 3.4. Ensayo de mutación en el receptor de células T

El aislamiento de los leucocitos mononucleares se realizó de la manera que se detalla en el apartado 3.1.1. Posteriormente se realizó la tinción de cada muestra por duplicado utilizando 7-amino-actinomicina D (7AAD, colorante vital utilizado para la exclusión de las células no viables), anticuerpos de ratón antiCD4 conjugados con ficoeritrina (PE, de *phycoerythrin*) y antiCD3 conjugados con fluoresceína (FITC, de *fluorescein isothiocyanate*), y se midió la frecuencia de mutantes CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> entre la población normal de células T CD4<sup>+</sup>. El control de isotipo se tiñó con los anticuerpos específicos de ratón conjugados con fluorocromos IgG2a-CD3-FITC e IgG1-CD4-PE.

El procedimiento experimental se realizó en oscuridad para evitar el descenso de fluorescencia de los colorantes conjugados con los anticuerpos. Se añadieron 20µl de cada anticuerpo y 7AAD a los leucocitos y se incubaron durante 15min en oscuridad. Después se añadió 1ml de PBS a los tubos y se centrifugaron a 2000rpm durante 5min. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en PBS y se repitió el paso anterior. Por último, se resuspendió el tubo del control de isotipo en 250µl de PBS y los otros dos en 500µl de PBS.

Las suspensiones celulares fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) siguiendo el protocolo propuesto por Kyoizumi *et al.* (1992) y Akiyama *et al.* (1995). El manejo del citómetro y el análisis de los datos obtenidos se realizaron con el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson). Después de situar la ventana para los linfocitos según tamaño y complejidad y excluir las células muertas (positivas para 7AAD), se obtuvieron los datos de fluorescencia de FITC (FL1) y PE (FL2). Se adquirieron un mínimo de 250.000 eventos de la ventana de linfocitos, y se estableció una ventana de mutantes CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> según los siguientes criterios (Figura 11). El límite superior de FL1 para la ventana de mutantes se

situó en el 4% (1/25) del valor de la intensidad del pico máximo de CD3 para células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> normales. Este límite superior es aproximadamente 7 veces más alto que el pico máximo del canal para FL1 en el control del isotipo. Los límites izquierdo y derecho para FL2 se establecieron respectivamente en valores la mitad y el doble de la intensidad del pico máximo de FL2 para las células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> normales. Los valores de las frecuencias de mutación (TCR-Mf) se calcularon como el número de eventos en la ventana de mutantes dividido por el total de células T CD4<sup>+</sup> en la distribución de flujo.



**FIGURA 11.** Diagrama de puntos de CD3-FITC frente a CD4-PE mostrando la situación de la ventana de linfocitos mutantes para el TCR CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (región R4).

#### 4. TOXICIDAD ENDOCRINA

##### 4.1. Análisis de prolactina

La determinación de las concentraciones plasmáticas de **prolactina** se llevó a cabo mediante una técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) sándwich, utilizando el kit comercial *DRG Prolactin ELISA EIA-1291*. Los pocillos de la microplaca que se utiliza para el ensayo están recubiertos con un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigénico único en la molécula de prolactina. Los sueros a analizar, los estándares (con los que se construirá la curva de calibrado) y el control se incuban en dichos pocillos junto con un anticuerpo antiprolactina conjugado con la enzima peroxidasa de rábano. Tras la incubación se realiza el lavado para eliminar el anticuerpo conjugado que no se ha unido. La cantidad de peroxidasa en el pocillo es proporcional a la concentración de prolactina en la muestra así que, una vez que se añade la disolución de sustrato de la enzima, la intensidad de color que se

genera, medida a 450nm, es directamente proporcional a la concentración de prolactina en la muestra. El método tiene una sensibilidad de 0.35ng/ml.

#### 4.2. Análisis de cortisol

Para la medida de la concentración plasmática de **cortisol** se utilizó el kit DRG Cortisol ELISA EIA-1887 siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en un ELISA competitivo. Los pocillos de la microplaca están recubiertos con un anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula de cortisol. Las muestras de suero, los estándares de calibración y el control se incuban en los pocillos junto con cortisol conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, con lo que el cortisol endógeno presente en ellos compite con el cortisol conjugado por su unión al anticuerpo fijado a los pocillos. Tras la incubación se eliminan por lavado todos los compuestos no unidos. La cantidad de conjugado enzimático unido es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en las muestras. Tras la adición de la disolución de sustrato de la enzima, se mide la intensidad de color desarrollado a 450nm, que será inversamente proporcional a la concentración de cortisol en los sueros a evaluar. La sensibilidad analítica de este test es de 2.5ng/ml.

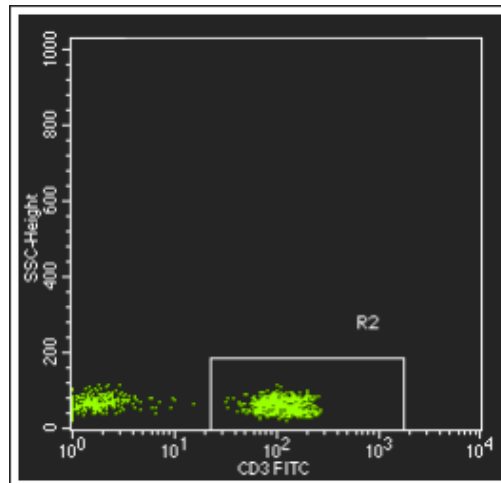
### 5. INMUNOTOXICIDAD

#### 5.1. Subpoblaciones linfocitarias

Los tubos Venoject® con EDTA se homogeneizaron por inversión y se repartieron 100µl de sangre completa (conteniendo aproximadamente  $10^6$  células) de cada muestra por duplicado en tubos de citometría. Los pasos siguientes se llevaron a cabo en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia de los anticuerpos. Se añadieron a los tubos 20µl de los siguientes anticuerpos de ratón conjugados con colorantes fluorescentes: CD3-FITC (para la determinación de linfocitos T), CD4-PE (para la determinación de linfocitos T colaboradores), CD8-PECy5 (*phycoerythrin* 5) (para la determinación de linfocitos T citotóxicos), CD19-PECy5 (para la determinación de linfocitos B), CD16-PE y CD56-PE (para la determinación de células NK). Los controles de isotipo se tiñeron con anticuerpos específicos de ratón conjugados con fluorocromos IgG2a-FITC, IgG1-PE e IgG1-PECy5. Las mezclas se incubaron durante 15min en oscuridad, a continuación se añadió 1ml de disolución de lisis (*FACSLysing solution*, Becton Dickinson) a todos los tubos para lisar los eritrocitos y se incubaron durante 8min. A continuación, se centrifugaron los tubos a 1600rpm durante 5min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1ml de PBS. Se realizó una nueva

centrifugación y finalmente se fijaron con 250µl de fijador (*CellFix*, Becton Dickinson), lo que permite conservar las muestras para realizar la determinación al día siguiente.

Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson). Tras situar la ventana para los linfocitos según tamaño y complejidad, se obtuvieron los datos de fluorescencia de FITC (FL1), PE (FL2) Y PECy5 (FL3). Se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos de la ventana de linfocitos en todos los casos. Los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup> fueron obtenidos a partir de la representación gráfica de la correspondiente fluorescencia frente a la complejidad (Figura 12). Los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se calcularon a partir de la representación de la fluorescencia de cada una de estas subpoblaciones frente a las células CD3<sup>+</sup>.



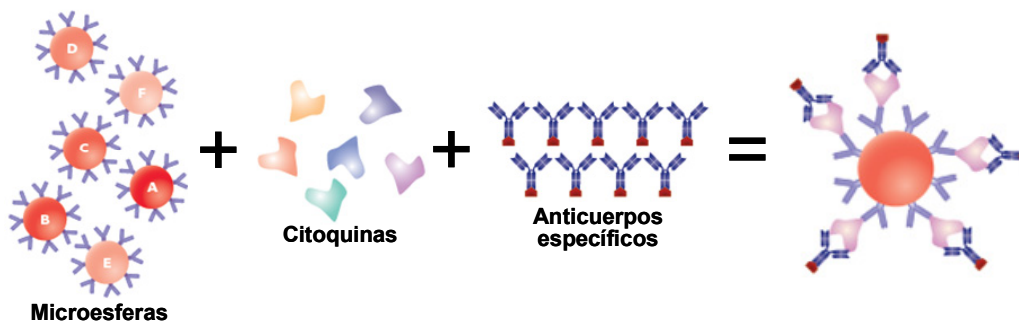
**FIGURA 12.** Diagrama de puntos de complejidad (SSC) frente a CD3-FITC para el cálculo del porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (región R2).

## 5.2. Citoquinas circulantes en plasma sanguíneo

Después del análisis de las subpoblaciones linfocitarias, el volumen de sangre remanente en los tubos de EDTA se centrifugó a 2500rpm durante 10min. Del plasma sobrenadante se recogieron alícuotas de 100µl de cada muestra y se congelaron a -80°C hasta su utilización.

Para la evaluación de las citoquinas circulantes en el plasma sanguíneo se utilizó el kit comercial BD<sup>TM</sup> *Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II*, siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Este kit emplea unas microesferas que permiten detectar y cuantificar simultáneamente 6 tipos de citoquinas diferentes: interleuquina-2 (IL-2),

interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10), interferón- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). El kit contiene seis poblaciones diferentes de microesferas con diferente intensidad de fluorescencia (que se detecta en el canal FL3), que portan en su superficie anticuerpos de captura específicos para cada tipo de citoquina que se desea analizar. Una vez las microesferas se han incubado con el plasma y han capturado las citoquinas correspondientes, se incuban con anticuerpos de detección específicos para cada citoquina conjugados con PE, de manera que forman complejos tipo “sándwich”. (Figura 13). Es necesario construir una recta de calibrado con patrones de las citoquinas a analizar, proporcionados en el kit, a partir de la cual se interpolan las concentraciones de las muestras de interés.

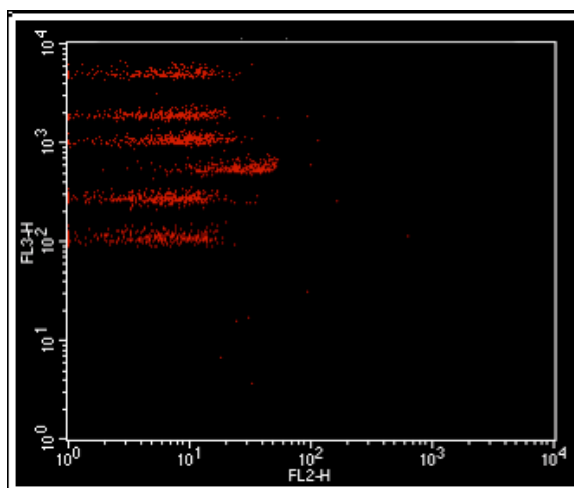


**FIGURA 13.** Fundamento de la técnica utilizada para el análisis de citoquinas circulantes: las microesferas con distinta intensidad de fluorescencia están recubiertas de anticuerpos de captura que se unen específicamente a una citoquina, y ésta a su vez se une a su anticuerpo de detección conjugado con un fluorocromo.

Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) para el análisis de las concentraciones de citoquinas. Después de situar la ventana para las microesferas según el tamaño y la complejidad, se obtuvieron los datos de fluorescencia de las seis poblaciones de citoquinas en los canales FL2 (detecta la fluorescencia de los anticuerpos específicos) y FL3 (detecta la fluorescencia de las microesferas) (Figura 14).

Se adquirieron un mínimo de 2.000 eventos en la ventana de citoquinas. La cuantificación de las diferentes citoquinas se realizó con el programa *BD CDA Analysis Software*, que halla las concentraciones de las citoquinas presentes en cada muestra mediante una interpolación de los datos a partir de la curva patrón construida previamente.





**FIGURA 14.** Diagrama de puntos de la fluorescencia de las distintas microesferas (FL3) frente a la fluorescencia de los anticuerpos específicos para cada citoquina (FL2).

### 5.3. Determinación de neopterina

Las concentraciones de neopterina en el plasma de los individuos se analizaron utilizando el kit comercial de BRAHMS, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en una cuantificación por ELISA competitivo. Los pocillos que se utilizan están recubiertos de anticuerpos anti-neopterina. Una vez agregado el conjugado enzimático – constituido por neopterina/fosfatasa alcalina – a los sueros a analizar, controles externos o estándares (que se utilizarán para hacer la recta de calibrado), la neopterina contenida en ellos compite con el conjugado enzimático por los lugares de unión de los anticuerpos de los pocillos, formando de esta manera un complejo enlazado a la fase sólida. Tras el lavado, que garantiza la eliminación de todos los compuestos no enlazados, se añade la disolución de sustrato de la enzima fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato). La enzima cataliza la disociación en 4-nitrofenol, de color amarillo. La reacción enzimática finaliza con la adición de sosa cáustica. La intensidad del color, medido a 405nm, es inversamente proporcional a la concentración de neopterina en el suero. El método tiene una sensibilidad de 2nM.

### 5.4. Determinación de triptófano y kinurenina

Las concentraciones de triptófano y kinurenina en plasma fueron determinadas mediante una metodología de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, de *high performance liquid chromatography*) en fase reversa utilizando 3-nitro-L-tirosina (Sigma) como estándar interno, desarrollada por Widner *et al.* (1997) y mejorada por Laich *et al.* (2002). El sistema cromatográfico utilizado constó de una bomba Varian 9010, un procesador

automático de muestras Jasco AS-950 con una unidad de refrigeración a 4°C y un bucle de inyección de 10µl.

La mezcla de calibración se preparó a partir de disoluciones stock de triptófano (Serva) y kinurenina (Merk) 1mM almacenadas a -20°C y descongeladas, y de albúmina 70g/l, que corresponde al promedio de concentración fisiológica en el suero humano. Antes de cada serie de determinaciones se preparó 1ml de disolución de calibración con 50µl de disolución de triptófano, 10µl de disolución de kinurenina y 940µl de disolución de albúmina. Se utilizó una mezcla de sueros congelada como estándar externo. La preparación de las muestras de suero, la disolución de calibración y el estándar externo fue realizada de la misma manera, tal y como se describe. Se diluyeron 100µl de la muestra elegida con 100µl de 3-nitro-L-tirosina 50µM, se le añadieron 25µl de ácido tricloroacético (Merk) 2M y se mezcló por agitación. Las muestras se centrifugaron a 12000g durante 6min a temperatura ambiente para separar las proteínas precipitadas, y se transfirieron 180µl del sobrenadante a nuevos viales, para poder utilizarlos en el procesador automático de muestras (Chromacol).

Para la separación se utilizaron cartuchos de fase reversa LiChroCART 55-4 (Merck) de 55mm de longitud, rellenos con Purosphere STAR RP<sub>18</sub> con tamaño de partícula de 3µm (Merck), junto con una precolumna C<sub>18</sub> en fase reversa (Merck). La fase móvil estuvo compuesta de ácido acético-acetato de sodio (Merck) 15mM a pH 4.0, conteniendo 27ml/l de acetonitrilo (Merck). La velocidad de flujo fue de 0.9ml/min a temperatura ambiente. La kinurenina y la 3-nitro-L-tirosina se midieron en un detector UV Jasco 975 a una longitud de onda de 360nm. El triptófano se cuantificó en un detector de fluorescencia Varian ProStar 360 a una longitud de onda de excitación de 286nm y de emisión de 366nm. Estos detectores fueron conectados en serie para permitir la determinación simultánea de los tres analitos. El control del sistema y la cuantificación de los picos se realizaron mediante el programa *Borwin* 1.5. Los tiempos de retención fueron de 2.3min para la kinurenina, 3.3min para la 3-nitro-L-tirosina y 4.3min para el triptófano. Las concentraciones de los analitos se calcularon según la altura de los picos, comparándolas con el estándar interno. La relación kinurenina/triptófano (Kin/Trp) se calculó para estimar la actividad de la enzima indolamina 2,3-desoxigenasa (IDO), expresándola en µM kinurenina/mM triptófano.

Se realizaron entre 30 y 40 determinaciones diarias y al finalizarlas se lavó el sistema con un gradiente creciente/decreciente de metanol puro durante 40min y se reemplazó la precolumna.

Las rectas de calibrado fueron lineales en el rango de concentraciones de 1-100 $\mu$ M para el triptófano ( $r=0.996$ ,  $P<0.01$ ) y de 0.006-6 $\mu$ M ( $r=0.999$ ,  $P<0.01$ ) para la kinurenina. Los coeficientes de variación de triptófano y kinurenina indicativos de la precisión inter-día del método cromatográfico fueron de 1.7% y 4.2%, respectivamente; los correspondientes a la variación intra-día fueron 1.0 y 1.4%, respectivamente; y los porcentajes de recuperación fueron de 99.3% $\pm$ 0.4% y 102.3% $\pm$ 1.0%, respectivamente.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tests Chi cuadrado de Pearson y  $t$  de Student se aplicaron para evaluar la relación entre las variables categóricas y las diferencias entre medias, respectivamente, en las características de la población a estudio.

Se realizó una evaluación preliminar del efecto de la exposición mediante el test  $t$  de Student en las variables que mostraron distribución normal según el test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó transformación logarítmica a las variables BNMN, MNMN, prolactina, cortisol, kinurenina y Kin/Trp para obtener una aproximación mejor a la distribución normal. No fue necesario realizar transformación de las variables %TDNA, TCR-Mf, MNcit, CBPI, triptófano, las subpoblaciones linfocitarias y las citoquinas. El test no paramétrico  $U$  de Mann-Whitney se aplicó a neopterina, NPB y NBUD, dado que no se obtuvo ninguna mejora en su distribución mediante transformación.

Para evaluar en mayor detalle el efecto de la exposición y otros factores que pudiesen influir en los resultados (factores de confusión) se utilizaron los modelos de regresión múltiple que mejor se ajustaron a los datos. Todos los modelos incluyeron ajuste por edad, sexo y consumo de tabaco (*pack-years*). Se aplicó regresión lineal a los datos transformados logarítmicamente de las variables continuas. La regresión de Poisson se llevó a cabo con los datos no transformados de TCR-Mf y MNcit, y con los datos transformados logarítmicamente de BNMN y MNMN. Por último, la regresión binomial negativa se aplicó a los datos no transformados de NPB y NBUD.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de regresión complementario solamente en la población expuesta para determinar el efecto del tiempo de exposición al fuel y de la utilización de equipos de protección individual durante las labores de limpieza, aplicando ajuste por edad, sexo y consumo de tabaco.

Además, se realizó un análisis de regresión logística adicional en la población expuesta incluyendo asimismo corrección por edad, sexo y consumo de tabaco para identificar la relación entre la presencia de sintomatología de origen diverso y el tiempo de exposición o el uso de equipamiento protector, incluyendo además la neopterina y los parámetros relacionados con la degradación del triptófano.

Las asociaciones entre variables fueron calculadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El nivel de significación estadística se estableció en 0.05. Los análisis se realizaron utilizando los paquetes estadísticos SPSS, versión 20 (SPSS, Inc.) y STATA versión 9.1 (StataCorp LP).

# *Resultados*

---



## RESULTADOS

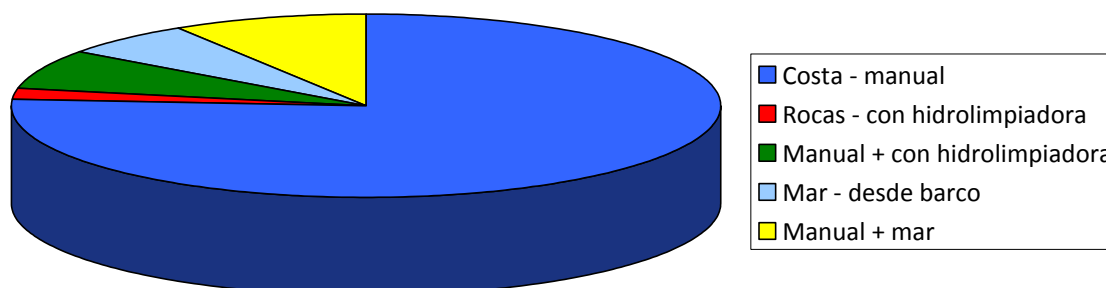
La población estudiada estuvo compuesta por un total de 104 individuos, de los cuales 54 estuvieron expuestos al fuel y 50 fueron controles. Las características generales de los grupos analizados se recogen en la Tabla 5. Ambos grupos no difirieron significativamente en cuanto a su distribución de género, edad o consumo de tabaco. Debido a que el número de exfumadores en la población fue bajo (11 controles y 6 expuestos), y además habían dejado de fumar hacía un mínimo de 4 años (media  $12.7 \pm 7.0$  años), decidimos incluirlos en el grupo de no fumadores. Para cuantificar el consumo de tabaco en los fumadores se calculó la variable *pack-years* según la fórmula:  $[(n^{\circ} \text{ cigarrillos/día}) \times (n^{\circ} \text{ años fumando})] / 20$ . La mayoría de individuos expuestos (82%) estuvieron en contacto con el fuel durante 8-10 meses, por lo que no se consideró pertinente establecer categorías en cuanto al tiempo de exposición. Esta variable expresada en horas se calculó en base al número total de días que las personas habían participado en las tareas de limpieza y al número de horas trabajadas por día.

TABLA 5: Descripción de la población estudiada.

	Controles	Expuestos	P-valor
Total	50 (48.1%)	54 (51.9%)	
Género			
<i>Varones</i>	30 (60.0%)	33 (61.1%)	0.908 <sup>b</sup>
<i>Mujeres</i>	20 (40.0%)	21 (38.9%)	
Edad <sup>a</sup>	47.0±10.2 (28-65)	47.9±11.2 (29-68)	0.672 <sup>c</sup>
Consumo de tabaco			
<i>No fumadores</i>	40 (80.0%)	37 (68.5%)	0.182 <sup>b</sup>
<i>Fumadores</i>	10 (20.0%)	17 (31.5%)	
<i>Cigarrillos/día<sup>a</sup></i>	17.0±11.7 (2-35)	15.8±9.4 (2-30)	0.779 <sup>c</sup>
<i>Años fumando<sup>a</sup></i>	27.5±10.4 (5-40)	21.9±13.1 (6-49)	0.233 <sup>c</sup>
<i>Pack-years<sup>a</sup></i>	23.2±14.2 (0.5-45.0)	16.7±15.9 (1.6-67.5)	0.280 <sup>c</sup>
Tiempo de exposición <sup>a</sup> (meses)		9.0±1.9 (2-10)	
Tiempo de exposición <sup>a</sup> (h)		1887±616 (450-3000)	
Equipamiento protector			
<i>Con guantes</i>		49 (90.7%)	
<i>Sin guantes</i>		5 (9.3%)	
<i>Con mono</i>		44 (81.5%)	
<i>Sin mono</i>		10 (18.5%)	
<i>Con mascarilla</i>		12 (22.2%)	
<i>Mascarilla ocasional</i>		28 (51.9%)	
<i>Sin mascarilla</i>		14 (25.9%)	

<sup>a</sup>Media±desviación estándar (rango); <sup>b</sup>test Chi<sup>2</sup>; <sup>c</sup>test t de Student.

En la Figura 15 se muestra la distribución de las labores de limpieza realizadas por los expuestos. La mayoría de ellos (76%) participó en la limpieza manual de las áreas de costa, el 2% utilizaron únicamente máquinas hidrolimpiadoras para eliminar el fuel de las rocas, el 7% combinó el trabajo manual con el uso de hidrolimpiadoras, el 6% realizó limpieza del mar desde embarcaciones y el 9% combinó la limpieza del mar con la manual.



**FIGURA 15:** Distribución de los individuos expuestos según el tipo de tarea de limpieza realizado.

## 1. GENOTOXICIDAD

Para evaluar la persistencia del daño genotóxico siete años después de la exposición al vertido de petróleo se determinó el daño primario en el ADN mediante el ensayo del cometa, la mutagenicidad mediante el ensayo de mutación en el TCR y el daño citogenético evaluando la frecuencia de MN mediante el test de MN realizado según dos metodologías diferentes: con bloqueo de la citocinesis y posterior evaluación microscópica, y mediante citometría de flujo. En la Tabla 6 se recogen los resultados medios de estos biomarcadores en los dos grupos estudiados y su comparación univariante.

Se obtuvieron diferencias significativas únicamente en la frecuencia de MN evaluada por citometría de flujo, para la que se encontró un valor más bajo en el grupo de expuestos, y en el índice de citotoxicidad CBPI, que mostró los resultados contrarios, ya que se observó incremento en los expuestos. El resto de los valores obtenidos en los parámetros de genotoxicidad fueron similares en ambas poblaciones, controles y expuestos.



**TABLA 6:** Resultados de los biomarcadores de genotoxicidad en las poblaciones analizadas.

	Controles		Expuestos		P-valor <sup>a</sup>
	N	Media ± DE	N	Media ± DE	
%TDNA	50	2.56 ± 0.15	54	2.24 ± 0.10	0.071
TCR-Mf (x10 <sup>-4</sup> )	49	3.13 ± 0.22	54	3.28 ± 0.22	0.618
MNcit (%)	50	5.06 ± 0.28	54	3.68 ± 0.26	<b>&lt;0.001</b>
BNMN (‰)	50	3.82 ± 0.36	54	4.59 ± 0.48	0.498
MNMN (‰)	50	3.11 ± 0.36	54	3.00 ± 0.34	0.692
NB (‰)	50	0.80 ± 0.21	54	0.66 ± 0.15	0.486
NBUD (‰)	50	1.51 ± 0.38	54	1.24 ± 0.18	0.495
CBPI	50	1.39 ± 0.01	54	1.45 ± 0.01	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a</sup>Test t de Student; DE: desviación estándar.

El efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco sobre los parámetros de genotoxicidad fue evaluado mediante modelos multivariantes en los que se introdujo ajuste simultáneo por estas variables. Los resultados obtenidos para el ensayo del cometa, el ensayo de mutación en el TCR y el test de MN por citometría de flujo se recogen en la Tabla 7. En la Tabla 8 se muestran los resultados para el test de MN con bloqueo de la citocinesis.

**TABLA 7:** Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en el ensayo del cometa, el ensayo de mutación en el TCR y test de MN por citometría de flujo.

	%TDNA		TCR-Mf		MNcit	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Exposición</b>						
<i>Controles</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>Expuestos</i>	0.90	(0.78-1.04)	1.01	(0.82-1.26)	0.73**	(0.60-0.88)
<b>Género</b>						
<i>Varones</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>Mujeres</i>	0.97	(0.84-1.13)	0.90	(0.71-1.12)	1.22*	(1.02-1.48)
<b>Edad (años)</b>	1.00	(0.99-1.00)	1.01	(1.00-1.02)	1.00	(0.99-1.01)
<b>Consumo de tabaco (pack-years)</b>	1.07	(0.90-1.26)	1.28*	(1.01-1.62)	1.04	(0.84-1.29)

IC: intervalo de confianza; \*P<0.05; \*\*P<0.01.

TABLA 8: Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en test de MN con bloqueo de la citocinesis.

Exposición	BNMN		MNMN		NPB		NBUD		CBPI	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<i>Controles</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Expuestos</i>	1.08	(0.79-1.49)	0.97	(0.68-1.38)	0.94	(0.50-1.79)	0.85	(0.51-1.41)	1.04**	(1.02-1.07)
<b>Género</b>										
<i>Varones</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mujeres</i>	1.06	(0.77-1.49)	1.15	(0.80-1.65)	1.30	(0.68-2.46)	0.93	(0.55-1.55)	0.99	(0.97-1.02)
<b>Edad (años)</b>	0.99	(0.98-1.01)	1.00	(0.98-1.02)	0.98	(0.96-1.01)	1.00	(0.99-1.03)	1.00	(0.99-1.00)
<b>Consumo de tabaco (pack-years)</b>	0.89	(0.61-1.29)	0.91	(0.60-1.39)	0.97	(0.93-1.01)	0.73	(0.40-1.33)	1.01	(0.98,1.04)

IC: intervalo de confianza; \*\* P&lt;0.01.

Las diferencias significativas alcanzadas en el grupo de expuestos cuando se comparan con los controles confirman el resultado del análisis univariante: descenso de la frecuencia de MNcit e incremento del CBPI. Se obtuvieron incrementos significativos en la razón de medias en mujeres respecto a los varones para la frecuencia de MN evaluados por citometría de flujo, y en fumadores respecto a los no fumadores para la frecuencia de mutación en el TCR. Además se observó un ligero incremento no significativo de la razón de medias con la edad para este último parámetro ( $P=0.065$ ), así como una correlación significativa entre estas dos variables (edad y TCR-Mf,  $r=0.209$ ;  $P=0.034$ ).

Para evaluar el posible efecto del tiempo de exposición al fuel y el uso de medidas protectoras (mono impermeable y mascarilla) mientras se desarrollaban las tareas de limpieza, se llevó a cabo un análisis multivariante adicional sólo en el grupo de expuestos, y los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

**TABLA 9:** Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en el ensayo del cometa, el ensayo de mutación en el TCR y el test de MN por citometría de flujo. Modelos ajustados por edad, género y consumo de tabaco.

	%TDNA		TCR-Mf		MNcit	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Mascarilla</b>						
<i>Con mascarilla</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>Mascarilla ocasional</i>	0.95	(0.77-1.19)	1.19	(0.78-1.83)	1.08	(0.74-1.57)
<i>Sin mascarilla</i>	1.01	(0.76-1.34)	1.42	(0.85-2.38)	1.09	(0.66-1.80)
<b>Mono</b>						
<i>Con mono</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>Sin mono</i>	0.74*	(0.57-0.96)	0.94	(0.61-1.44)	0.87	(0.55-1.37)
<b>Tiempo exposición (h)</b>	1.00	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)

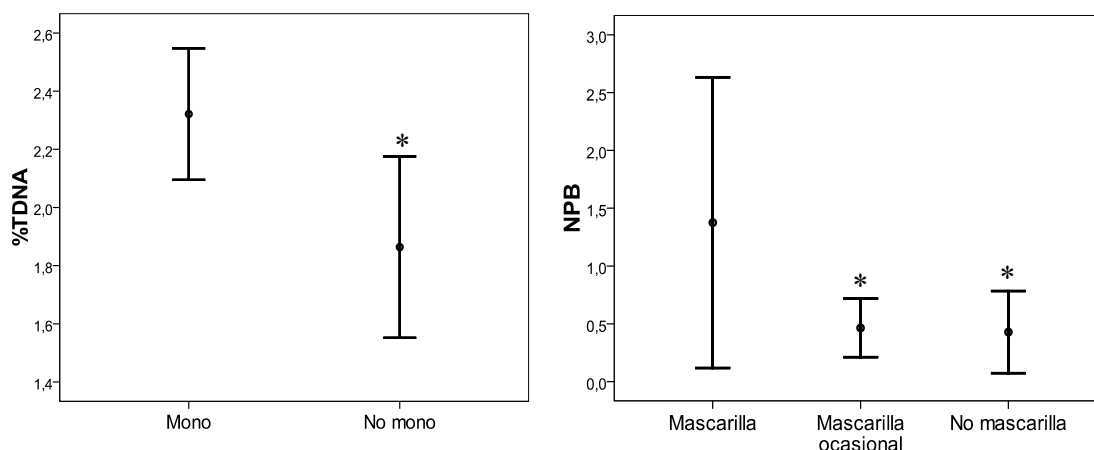
CI: intervalo de confianza; \* $P<0.05$ .

**TABLA 10:** Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en el test de MN con bloqueo de la citocinesis. Modelos ajustados por edad, género y consumo de tabaco.

	BNMN		MNMN		NPB		NBUD		CBPI	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Mascarilla</b>										
<i>Con mascarilla</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mascarilla ocasional</i>	0.90	(0.52-1.56)	0.61	(0.33-1.13)	0.33*	(0.14-0.78)	0.69	(0.37-1.31)	0.99	(0.95-1.04)
<i>Sin mascarilla</i>	0.81	(0.38-1.72)	0.47	(0.19-1.12)	0.20*	(0.04-0.87)	0.45	(0.18-1.15)	1.00	(0.95-1.05)
<b>Mono</b>										
<i>Con mono</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Sin mono</i>	0.88	(0.41-1.85)	0.96	(0.80-1.14)	1.41	(0.29-6.87)	0.63	(0.24-1.63)	0.97	(0.95-1.05)
<b>Tiempo exposición (h)</b>	1.00	(0.90-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)

IC: intervalo de confianza; \*P<0.05.

No se evaluó el efecto de usar guantes ya que el 91% de los expuestos los utilizaron para proteger sus manos del fuel (Tabla 5). Sorprendentemente, los únicos resultados significativos obtenidos se corresponden con descensos del %TDNA en individuos que no se pusieron ropas protectoras y de la frecuencia de NPB en sujetos que no usaron mascarilla o la usaron sólo de forma ocasional. Estos resultados se aprecian con mayor claridad en la Figura 16.



**FIGURA 16:** Efecto del uso de equipamiento protector sobre el ensayo del cometa y la frecuencia de puentes nucleoplásmicos. Las barras indican el intervalo de confianza 95% de la media. \* $P < 0.05$ , diferencia significativa respecto al uso de mono o mascarilla.

## 2. TOXICIDAD ENDOCRINA

En este estudio se determinaron las concentraciones séricas de las hormonas prolactina y cortisol como biomarcadores de toxicidad endocrina. En la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos para estos biomarcadores en las poblaciones control y expuesta. En la concentración de cortisol se observó un incremento significativo en los expuestos, mientras que no hubo diferencias entre ambos grupos respecto a la concentración de prolactina. No obstante, los valores medios obtenidos en las dos poblaciones se situaron dentro del rango de referencia tanto para la prolactina como para el cortisol (Melmed *et al.*, 2011).

**TABLA 11:** Resultados de los biomarcadores de toxicidad endocrina en los grupos de estudio.

	Controles		Expuestos		P-valor <sup>a</sup>
	N	Media ± DE	N	Media ± DE	
Prolactina (ng/ml)	50	7.42 ± 0.38	54	9.30 ± 1.00	0.081
Cortisol (ng/ml)	50	149.56 ± 2.27	54	160.91 ± 3.11	<b>0.004</b>

<sup>a</sup>Test *t* de Student; DE: desviación estándar.

En el análisis multivariante aplicado posteriormente, introduciendo las variables exposición, edad, género y consumo de tabaco de forma simultánea, se obtuvieron los resultados recogidos en la Tabla 12. El efecto significativo de la exposición sobre los niveles de cortisol, previamente obtenido mediante análisis univariante, quedó confirmado. No se observó efecto del género o del consumo de tabaco sobre ninguna de las dos hormonas evaluadas, pero sí se obtuvo un ligero aunque significativo descenso en la prolactina asociado con la edad.

**TABLA 12:** Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las concentraciones séricas de prolactina y cortisol.

	Prolactina		Cortisol	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Expuestos</b>				
<i>Controles</i>	1.00		1.00	
<i>Expuestos</i>	1.16	(0.99-1.36)	1.07**	(1.02-1.12)
<b>Género</b>				
<i>Varones</i>	1.00		1.00	
<i>Mujeres</i>	1.03	(0.87-1.21)	1.02	(0.98-1.07)
<b>Edad (años)</b>	0.99*	(0.98-1.00)	0.99	(0.99-1.00)
<b>Consumo de tabaco (pack-years)</b>	0.99	(0.98-1.01)	1.00	(0.99-1.00)

IC: intervalo confianza; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

En la evaluación del efecto del tiempo de exposición y el uso de medidas protectoras mientras se realizaron los trabajos de limpieza en contacto con el fuel, realizada mediante un análisis multivariante en la población expuesta, no se observaron diferencias en los niveles de biomarcadores endocrinos asociadas al uso de ninguno de los equipos protectores tenidos en cuenta (mono y mascarilla), ni tampoco al tiempo de exposición (Tabla 13).

**TABLA 13:** Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en los biomarcadores de toxicidad endocrina. Modelos ajustados por edad, género y consumo de tabaco.

	Prolactina		Cortisol	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Mascarilla</b>				
<i>Con mascarilla</i>	1.00		1.00	
<i>Mascarilla ocasional</i>	0.89	(0.63-1.24)	0.91	(0.82-1.01)
<i>Sin mascarilla</i>	0.67	(0.44-1.02)	0.90	(0.79-1.03)
<b>Mono</b>				
<i>Con mono</i>	1.00		1.00	
<i>Sin mono</i>	1.90	(0.64-1.24)	1.08	(0.96-1.22)
<b>Tiempo exposición (h)</b>	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)

IC: intervalo de confianza.

### 3. INMUNOTOXICIDAD

La evaluación de los posibles efectos inmunotóxicos asociados a la exposición previa al fuel del *Prestige* se realizó mediante la determinación de las concentraciones séricas de neopterina y los productos relacionados con el metabolismo del triptófano, los porcentajes de subpoblaciones linfocitarias y los niveles de citoquinas circulantes.

En la Tabla 14 se recogen los valores medios obtenidos para cada uno de estos biomarcadores en los dos grupos estudiados, así como el *P*-valor para su comparación univariante. Las únicas diferencias significativas observadas entre controles y expuestos consisten en descensos significativos en los niveles de kinurenina y el porcentaje de células CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> en la población de expuestos.

Los valores medios obtenidos en ambos grupos se situaron dentro del rango de referencia para la neopterina (Murr *et al.*, 2002), y todas las subpoblaciones linfocitarias (García-Dabrio *et al.*, 2012). Los resultados para el triptófano, kinurenina y la relación Kin/Trp fueron similares a los descritos previamente (Frick *et al.*, 2004; Capuron *et al.*, 2011). Por el contrario, no existen niveles de referencia descritos para las concentraciones de citoquinas plasmáticas, siendo los valores referidos para poblaciones control muy diferentes entre distintos estudios (COPE, 2011).

**TABLA 14:** Resultados de los biomarcadores de inmunotoxicidad en las poblaciones analizadas.

	Controles		Expuestos		P-valor <sup>a</sup>
	N	Media ± DE	N	Media ± DE	
Neopterina (nmol/l)	50	5.83 ± 0.29	54	5.53 ± 0.20	0.469
Triptófano (μmol/l)	50	73.70 ± 2.17	53	69.96 ± 1.78	0.186
Kinurenina (μmol/l)	49	3.08 ± 0.23	53	2.53 ± 0.18	<b>0.039</b>
Kin/Trp (μmol/mmol)	49	38.19 ± 2.49	53	34.86 ± 2.19	0.327
%CD3 <sup>+</sup>	45	65.96 ± 1.74	44	69.87 ± 1.35	0.080
%CD4 <sup>+</sup>	45	35.61 ± 1.64	44	38.76 ± 1.72	0.189
%CD8	45	25.63 ± 1.32	44	22.90 ± 1.29	0.142
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	45	1.62 ± 0.15	44	2.05 ± 0.18	0.070
%CD19 <sup>+</sup>	45	9.23 ± 0.67	44	10.47 ± 0.76	0.223
%CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	45	23.46 ± 1.64	44	16.75 ± 1.33	<b>0.002</b>
IL2 (pg/ml)	35	5.65 ± 0.32	40	5.64 ± 0.09	0.572
IL4 (pg/ml)	30	1.72 ± 0.95	37	0.83 ± 0.09	0.555
IL6 (pg/ml)	35	8.73 ± 0.73	40	8.77 ± 0.29	0.439
IL10 (pg/ml)	35	2.43 ± 0.50	40	2.34 ± 0.08	0.110
TNFα (pg/ml)	35	10.80 ± 0.13	40	10.87 ± 0.04	0.481
IFNγ (pg/ml)	35	6.32 ± 0.23	40	6.65 ± 0.19	0.221

<sup>a</sup>Test t de Student; DE: desviación estándar.

Al igual que para el resto de los biomarcadores se realizó un análisis de regresión multivariante posterior para evaluar el efecto de la exposición, género, edad y consumo de tabaco. Los resultados obtenidos en dicho análisis se recogen en la Tabla 15 para la neopterina y los productos del metabolismo del triptófano, en la Tabla 16 para las subpoblaciones linfocitarias y en la Tabla 17 para las citoquinas circulantes. Los datos de nuevo confirman el descenso de kinurenina y %CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> en individuos expuestos observado en el análisis univariante. El grupo de mujeres mostró descensos significativos con respecto a los varones para el triptófano y el porcentaje de células CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> e incrementos significativos para las subpoblaciones linfocitarias %CD4<sup>+</sup> y %CD19<sup>+</sup>, para la tasa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y para el IFNγ. La edad influyó positivamente sobre los niveles de neopterina, y el tabaco únicamente afectó de forma significativa a la fracción celular CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, con un ligero descenso asociado a su consumo.



**TABLA 15:** Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las concentraciones séricas de neopterinina y los productos del metabolismo del triptófano.

Exposición	Neopterinina		Triptófano		Kinurenina		Kin/Trp	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<i>Controles</i>	1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Expuestos</i>	0.96	(0.87-1.06)	0.95	(0.88-1.02)	0.82*	(0.70-0.98)	0.92	(0.78-1.08)
<b>Género</b>								
<i>Varones</i>	1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mujeres</i>	0.94	(0.86-1.05)	0.91*	(0.84-0.98)	0.99	(0.84-1.19)	1.08	(0.91-1.27)
<b>Edad (años)</b>	1.01*	(1.00-1.01)	1.00	(0.99-1.00)	1.01	(0.99-1.02)	1.01	(0.99-1.01)
<b>Consumo de tabaco (pack-years)</b>	1.00	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.01)	1.00	(0.99-1.01)

IC: intervalo de confianza; \*  $P < 0.05$ .

TABLA 16: Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las subpoblaciones linfocitarias.

Exposición	%CD3 <sup>+</sup>		%CD4 <sup>+</sup>		%CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		%CD19 <sup>+</sup>		%CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<i>Controles</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Expuestos</i>	1.07	(0.99-1.15)	1.10	(1.96-1.25)	0.90	(0.77-1.04)	1.22	(0.97-1.54)	1.13	(0.95-1.35)	0.69**	(0.56-0.86)
<b>Género</b>												
<i>Varones</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mujeres</i>	1.04	(0.97-1.12)	1.26**	(1.10-1.44)	0.91	(0.78-1.07)	1.38**	(1.09-1.76)	1.39**	(1.16-1.67)	0.70**	(0.56-0.88)
<b>Edad (años)</b>	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.01)	0.99	(0.98-1.00)	1.01	(0.99-1.02)	1.00	(0.99-1.01)	1.01	(0.99-1.01)
<b>Consumo de tabaco (pack-years)</b>	1.02	(0.94-1.10)	1.01	(0.99-1.01)	1.00	(0.99-1.01)	1.01	(0.99-1.01)	1.01	(0.99-1.01)	0.99*	(0.98-0.99)

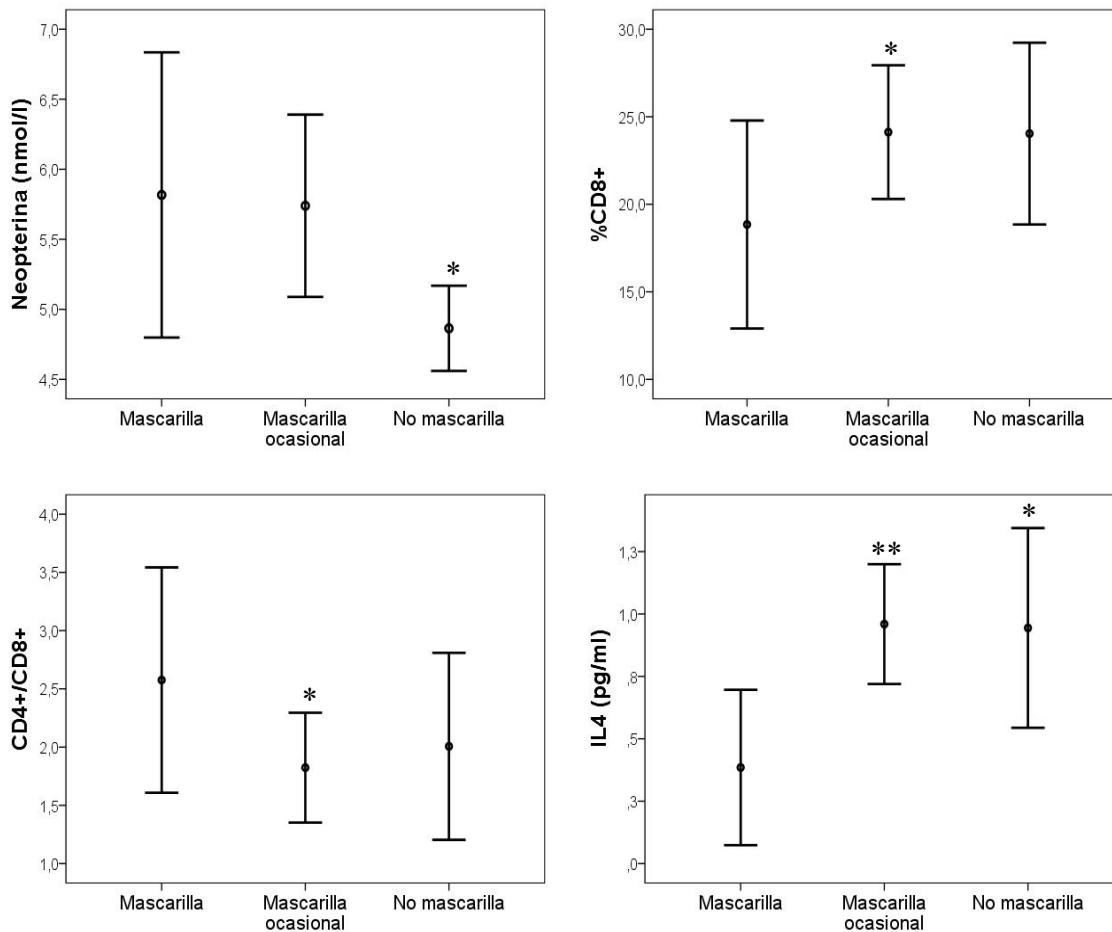
IC: intervalo de confianza; \*P&lt;0.05; \*\*p&lt;0.01.

TABLA 17: Efecto de la exposición, el género, la edad y el consumo de tabaco en las concentraciones de citoquinas circulantes.

Exposición	IL2		IL4		IL6		IL10		TNF $\alpha$		IFN $\gamma$	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<i>Controles</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Expuestos</i>	1.02	(0.95-1.11)	1.16	(0.63-2.12)	1.04	(0.93-1.15)	1.17	(0.98-1.40)	1.01	(0.99-1.03)	1.06	(0.97-1.16)
<b>Género</b>												
<i>Varones</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mujeres</i>	0.99	(0.92-1.07)	1.60	(0.88-2.91)	1.03	(0.93-1.15)	1.16	(0.97-1.39)	1.02	(0.99-1.04)	1.13**	(1.03-1.24)
<b>Edad (años)</b>	0.99	(0.99-1.00)	0.99	(0.97-1.03)	0.99	(0.99-1.01)	1.00	(0.99-1.01)	1.00	(1.00-1.00)	1.00	(0.99-1.00)
<b>Consumo de tabaco (pack-years)</b>	1.00	(0.99-1.00)	1.01	(0.98-1.03)	1.00	(0.99-1.01)	0.99	(0.98-1.00)	1.00	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.01)

IC: intervalo de confianza; \*\*P&lt;0.01.

Tras llevar a cabo un nuevo análisis multivariante en el grupo de los expuestos para evaluar el efecto del uso de medidas de protección (ropas y mascarilla) y del tiempo de exposición al fuel se obtuvieron los resultados que se recogen en las Tablas 18 a 20. Los individuos que no utilizaron siempre mascarilla mostraron una tendencia al descenso en las concentraciones de neopterina, que fue significativa en aquellos que nunca la usaron. También se observó un incremento en la subpoblación linfocitaria %CD8<sup>+</sup>, y por consiguiente un descenso en la tasa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, asociado con la ausencia de uso de mascarilla, significativo en el grupo que la utilizaba de manera ocasional. Además, todos los individuos que no utilizaron mascarilla experimentaron un incremento significativo en la concentración de la citoquina IL4. No se obtuvo ningún efecto relacionado con el uso de ropas protectoras o con el tiempo de exposición. La Figura 17 resume estos resultados, mostrando únicamente aquellos para los que se obtuvieron diferencias significativas.



**FIGURA 17:** Efecto del uso de mascarilla sobre los parámetros neopterina, %CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e IL4. Las barras indican el intervalo de confianza 95% de la media. \*P<0.05, diferencia significativa respecto al uso de mono o mascarilla.

**TABLA 18:** Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en las concentraciones séricas de neopterina y los productos del metabolismo del triptófano.

	Neopterina		Triptófano		Kinurenina		Kin/Trp	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Mascarilla</b>								
<i>Con mascarilla</i>	1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mascarilla ocasional</i>	0.92	(0.78-1.08)	1.10	(0.95-1.26)	0.97	(0.73-1.30)	0.86	(0.66-1.11)
<i>Sin mascarilla</i>	0.79*	(0.64-0.97)	1.12	(0.94-1.35)	1.10	(0.75-1.59)	0.94	(0.67-1.31)
<b>Mono</b>								
<i>Con mono</i>	1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Sin mono</i>	1.02	(0.85-1.23)	1.03	(0.86-1.23)	1.14	(0.79-1.64)	1.11	(0.81-1.54)
<b>Tiempo exposición (h)</b>	1.00	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)

IC: intervalo de confianza; \*  $p < 0.05$ .

TABLA 19: Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en las subpoblaciones linfocitarias.

	%CD3 <sup>+</sup>		%CD4 <sup>+</sup>		%CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		%CD19 <sup>+</sup>		%CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Mascarilla</b>												
<i>Con mascarilla</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mascarilla ocasional</i>	1.06	(0.94-1.20)	0.85	(0.67-1.09)	1.48*	(1.10-1.98)	0.58*	(0.37-0.92)	1.22	(0.86-1.74)	0.74	(0.47-1.16)
<i>Sin mascarilla</i>	1.05	(0.90-1.23)	0.90	(0.66-1.23)	1.45	(0.99-2.12)	0.62	(0.34-1.12)	0.81	(0.52-1.28)	1.01	(0.57-1.80)
<b>Mono</b>												
<i>Con mono</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Sin mono</i>	0.98	(0.85-1.13)	1.01	(0.76-1.33)	1.05	(0.75-1.47)	0.96	(0.57-1.63)	1.12	(0.75-1.68)	0.98	(0.59-1.64)
<b>Tiempo exposición (h)</b>	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)

IC: intervalo de confianza; \*P&lt;0.05.

**TABLA 20:** Efecto del uso de equipamiento protector y del tiempo de exposición en las concentraciones de citoquinas circulantes.

	IL2		IL4		IL6		IL10		TNF $\alpha$		IFN $\gamma$	
	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%	Razón de medias	IC 95%
<b>Mascarilla</b>												
<i>Con mascarilla</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Mascarilla ocasional</i>	1.00	(0.91-1.11)	4.30**	(1.83-10.09)	0.94	(0.82-1.08)	1.06	(0.90-1.24)	1.00	(0.98-1.02)	1.00	(0.85-1.18)
<i>Sin mascarilla</i>	1.01	(0.89-1.13)	3.06*	(1.18-7.95)	1.08	(0.92-1.26)	1.03	(0.86-1.25)	1.02	(0.99-1.04)	0.93	(0.77-1.13)
<b>Mono</b>												
<i>Con mono</i>	1.00		1.00		1.00		1.00		1.00		1.00	
<i>Sin mono</i>	0.99	(0.90-1.10)	1.03	(0.45-2.34)	0.89	(0.78-1.02)	0.89	(0.76-1.05)	1.01	(0.98-1.03)	1.14	(0.96-1.34)
<b>Tiempo exposición (h)</b>	0.99	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	0.99	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)	1.00	(0.99-1.00)

IC: intervalo de confianza; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Por otra parte, al analizar las posibles asociaciones entre variables se obtuvieron correlaciones significativas para la neopterinina con los tres parámetros del metabolismo del triptófano, positivas para kinurenina ( $r=0.312$ ,  $P=0.001$ ) y la relación Kin/Trp ( $r=0.395$ ,  $P<0.001$ ), e inversa para el triptófano ( $r=-0.217$ ,  $P=0.028$ ).

#### 4. SINTOMATOLOGÍA

En los cuestionarios cubiertos por los individuos expuestos se incluyeron preguntas para obtener información sobre ciertos síntomas generales de salud que pudiesen estar relacionados con la exposición a los componentes del fuel, incluyendo algunos de tipo respiratorio (problemas respiratorios, sofocos, asma), de tipo dermatológico (picor, eritema, irritación en piel, mucosas u ojos) y síntomas psico-neurológicos (dolor de cabeza, ansiedad, depresión, insomnio) experimentados desde la exposición. El 26% de los individuos expuestos experimentaron síntomas respiratorios, el 22% síntomas dermatológicos y el 39% síntomas psico-neurológicos. Los resultados de los modelos logísticos de regresión, ajustados por edad, género y consumo de tabaco, mostraron que ninguno de los síntomas estaba influenciado por el uso de los equipos de protección. Sin embargo, se obtuvo un incremento significativo en la frecuencia de síntomas psico-neurológicos asociado con los niveles de neopterinina (razón de medias 3.27, intervalo de confianza 95% 1.11-9.57,  $P=0.031$ ), así como una tasa más elevada de este tipo de síntomas en mujeres frente a varones (razón de medias 28.45, intervalo de confianza 95% 2.75-294.24,  $P=0.005$ ).



## *Discusión*

---



## DISCUSIÓN

Como consecuencia del accidente del buque *Prestige*, ocurrido en noviembre de 2002, se derramaron 67.000 toneladas de fuel pesado frente a las costas gallegas, contaminando una amplia zona del litoral que incluyó todo el norte de España, costas portuguesas e incluso del sur de Francia. Una enorme movilización humana tuvo lugar durante los meses siguientes para colaborar en las labores de limpieza y recuperación del territorio afectado, generando la aparición de un sector poblacional expuesto de manera más o menos intensa y prolongada al fuel que contenía el buque.

En las últimas décadas, se han sucedido numerosas catástrofes de grandes petroleros frente a las costas de diversos países. Para estudiar las posibles consecuencias de la exposición a los vertidos de petróleo sobre la salud humana se han llevado a cabo diversos estudios epidemiológicos en los que se evaluaron diferentes indicadores de toxicidad asociados a este tipo de exposiciones, correspondiendo la mayoría de ellos a marcadores de toxicidad aguda o efectos psicológicos (revisado en Aguilera *et al.*, 2010). Tras el vertido del *Prestige* se realizaron los primeros estudios enfocados a la evaluación de los posibles efectos genotóxicos, endocrinos e inmunológicos en los individuos implicados. Los resultados obtenidos, que se comentarán en detalle más adelante, pusieron de manifiesto la existencia de una serie de alteraciones y, como consecuencia, la necesidad de llevar a cabo un seguimiento de esas poblaciones. Es por ello que el principal objetivo del presente estudio consistió en determinar la posible persistencia de las alteraciones detectadas inicialmente tras siete años de la exposición. Aunque somos conscientes de que el tamaño de la población analizada es limitado, debido a las dificultades para reclutar individuos expuestos tanto tiempo después del vertido, en este trabajo se lleva a cabo por primera vez una nueva evaluación de este tipo de alteraciones en una población expuesta a un vertido de fuel varios años después de la exposición.

### 1. GENOTOXICIDAD

Los agentes genotóxicos son capaces de interaccionar con el ADN, pudiendo inducir con ello la aparición de diversos cambios en el genoma (Arafa *et al.*, 2008). Estos cambios pueden a su vez provocar la generación de mutaciones en el material genético e interferir con la transferencia de la información genética (Barile, 2008). El ser humano está continuamente expuesto a diversos agentes químicos, físicos y biológicos presentes en su medio ambiente que pueden alterar su material genético. Es por tanto necesario evaluar las posibles alteraciones

biológicas surgidas de estas exposiciones, y para ello los ensayos de genotoxicidad y mutagénesis constituyen las herramientas idóneas (Maurici *et al.*, 2005). No obstante, debido a que se trata de fenómenos complejos que pueden ocurrir a diferentes niveles, no existe un único ensayo capaz de detectar todas estas alteraciones, por lo que generalmente se utilizan varios en combinación, a fin de determinar el tipo de lesiones provocadas y el alcance del daño genético relacionado con una exposición particular. En concreto, en este trabajo se han utilizado el ensayo del cometa, el test de MN y el ensayo de mutación en el TCR.

La versión alcalina del ensayo del cometa posibilita la detección de daño primario en el ADN, esto es, roturas de cadena sencilla, sitios sensibles al álcali (como los aductos en el ADN, que generan sitios abásicos que darán lugar a roturas en contacto con el medio alcalino) y procesos incompletos de reparación por escisión (Singh *et al.*, 1988; Olive *et al.*, 1992; Collins, 2004). El desarrollo de esta metodología es sencillo y posee gran sensibilidad, presentando además la ventaja adicional de que detecta el daño a nivel de células individuales, en comparación con otros métodos que evalúan daño en el ADN tales como la elución alcalina o la sedimentación alcalina en sacarosa. El parámetro cuantitativo que se ha empleado en este ensayo para la estimación del daño ocasionado sobre el ADN ha sido el porcentaje de ADN en la cola del cometa (%TDNA), relacionado de forma directa con la tasa de roturas de cadena sencilla que se producen por efecto de un agente genotóxico (Singh *et al.*, 1988). El %TDNA ha sido reconocido como el parámetro más útil – frente a la longitud de la cola o el momento de la cola del cometa –, ya que se relaciona de forma lineal con la frecuencia de roturas, no se ve afectado en gran medida por los ajustes del umbral de fluorescencia, y permite la determinación del daño en el rango más amplio posible (en teoría de 0 a 100%), aportando además una indicación muy clara por la apariencia real de los cometas (Collins, 2004). Algunos autores han sugerido también que la utilización del %TDNA representa una variación más clara del daño en determinados casos en los que la longitud de la cola del cometa no distingue claramente entre las distintas dosis de agente genotóxico (Olive *et al.*, 1992; Mckelvey-Martin, 1993; Anderson *et al.*, 1994).

El test de MN evalúa alteraciones cromosómicas estables, que derivan o bien de roturas de doble cadena del ADN que no se han reparado (efectos clastogénicos) o bien de alteraciones a nivel del centrómero de los cromosomas (efectos aneugénicos), y son un buen indicador de estadios tempranos de carcinogénesis (Decordier *et al.*, 2011). Es por ello que se usa con mucha frecuencia para determinar los efectos de la exposición a agentes genotóxicos en poblaciones humanas. En el presente trabajo se han utilizado dos variantes del test de MN:

la evaluación por citometría de flujo y el ensayo con bloqueo de la citocinesis y evaluación microscópica. Ambas técnicas presentan ventajas e inconvenientes con respecto a la otra. La evaluación por citometría de flujo es una técnica muy rápida que permite obtener y analizar los datos procedentes de un gran número de células en poco tiempo, no precisa del cultivo previo de las células, el protocolo es sencillo y altamente automatizado y la determinación de los MN se realiza de una forma totalmente objetiva, ya que no interviene el ojo humano (Nüsse y Marx, 1997). La evaluación por microscopía, por su parte, es una técnica ampliamente validada que no posee la rapidez en la obtención de resultados que tiene su homóloga, pero además del análisis de la frecuencia de MN permite estudiar otros parámetros genotóxicos, como la presencia de NPB, NBUD, o MNMN, y citotóxicos, como la determinación del índice CBPI. Los NPB se originan a partir de cromosomas dicéntricos, y los NBUD representan el proceso de eliminación del ADN amplificado, los complejos de reparación del ADN y posiblemente cromosomas excedentes de células aneuploides (Fenech *et al.*, 2011). El recuento de MNMN ofrece información de la frecuencia de MN que están ya presentes en los linfocitos *in vivo*, puesto que supone un reflejo de la expresión de MN en las células precursoras de los linfocitos (en el timo, médula ósea, bazo y nódulos linfáticos) (Fenech, 2007).

El ensayo de mutación en el TCR, por su parte, permite identificar y cuantificar los linfocitos que han experimentado alguna mutación en las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  de dicho receptor y que, en consecuencia, no expresan el complejo CD3/TCR en su superficie. Este ensayo presenta una serie de ventajas frente a otros ensayos de mutagenicidad que se usan habitualmente, ya que utiliza linfocitos frescos, necesita muy poco volumen de sangre (1ml es suficiente), no presenta restricciones respecto al genotipo del donante y los clones de células T mutantes pueden ser aislados tras la evaluación y cultivados *in vitro* para llevar a cabo el análisis molecular de la mutación. Además, utiliza anticuerpos disponibles comercialmente de uso rutinario en clínica y basta con un citómetro de flujo de un único láser (de 480nm) para su cuantificación, lo que facilita que este ensayo pueda realizarse en gran número de laboratorios (Nakamura *et al.*, 1991; Kyoizumi *et al.*, 1992). Aparte de estas ventajas, la validez de esta técnica para detectar los efectos genotóxicos producidos por distintas exposiciones ha sido ya demostrada en individuos expuestos a radiaciones (Kyoizumi *et al.*, 1992) y en pacientes de cáncer tratados con radioterapia (Kyoizumi *et al.*, 1992; Iwamoto *et al.*, 1994; Ishioka *et al.*, 1997; Vershenya *et al.*, 2004) o quimioterapia (Sawada *et al.*, 1998; Lanza *et al.*, 1999).

Diversos trabajos previos demostraron efectos genotóxicos en los individuos expuestos al fuel del *Prestige* como consecuencia de su participación en las tareas de limpieza. Nuestro grupo de investigación realizó un primer estudio en un pequeño grupo de voluntarios implicados en la limpieza y necropsias de aves petroleadas, observando en ellos incremento significativo de daño primario en el ADN (evaluado mediante el ensayo del cometa) y también un ligero aunque no significativo aumento en la frecuencia de MN (Laffon *et al.*, 2006). En un estudio de mayor envergadura en el que se analizaron personas que participaron en la limpieza de zonas costeras se comprobó que todos los expuestos, tanto voluntarios que únicamente estuvieron expuestos durante 5 días como trabajadores contratados que llevaban varios meses en contacto con el fuel, presentaban aumento de daño primario en el ADN. Este tipo de daño fue marcadamente superior en el grupo de voluntarios, por lo que se sugirió la posibilidad de una respuesta adaptativa en los trabajadores, como consecuencia de la exposición continuada a los compuestos nocivos del fuel durante un periodo prolongado (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a). Sin embargo, únicamente el conjunto de trabajadores contratados mostraron incremento significativo de daño citogenético (frecuencias de MN y SCE) y descenso del índice de citotoxicidad CBPI (Pérez-Cadahía *et al.* 2006, 2007, 2008b), sugiriendo que era necesario un tiempo relativamente largo de exposición para que esos daños llegaran a ponerse de manifiesto.

Por otra parte, el grupo de Rodríguez-Trigo *et al.* (2010) llevaron a cabo un trabajo en marineros expuestos al fuel del *Prestige* tomando las muestras dos años después de la exposición. En la determinación de las aberraciones cromosómicas (otro tipo de daño citogenético), obtuvieron incrementos significativos en ciertos tipos de alteraciones cromosómicas estructurales en los expuestos respecto a la población control. Además, Ji *et al.* (2011) observaron capacidad genotóxica en sedimentos recolectados del vertido de fuel del *Hebei Spirit* (Corea del Sur, 2007) dos años después del vertido, por lo que recomendaban que se realizasen estudios de seguimiento a largo plazo para evaluar el impacto genotóxico tanto en poblaciones humanas como en la naturaleza.

Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la evaluación de la genotoxicidad mostraron que no hay diferencias significativas en cuanto a daños primarios en el ADN, daños citogenéticos (evaluados mediante el test de MN con bloqueo de la citocinesis) o mutagenicidad en los individuos que estuvieron expuestos al fuel del *Prestige* hace 7 años. El ensayo del cometa detecta lesiones en el ADN que suelen ser reparadas de manera generalmente rápida, siendo por lo tanto un reflejo de exposiciones recientes (Dusinska y

Collins, 2008). En consecuencia, era de esperar que tras siete años los individuos expuestos hubiesen retornado a niveles basales de este tipo de daño primario. Por su parte, los MN expresan un tipo de daño cromosómico ya fijado en las células, puesto que en el momento de la evaluación éstas ya han debido pasar por, al menos, una división celular; por tanto los MN suponen una manifestación de exposiciones experimentadas a medio plazo. Por lo tanto, los niveles de daño citogenético que se encontraban elevados en los sujetos expuestos al fuel durante varios meses en el momento de la exposición y, al menos, dos años después (en forma de aberraciones cromosómicas según los resultados de Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010), ya no se diferencian de los niveles control tras siete años.

La razón de incluir el ensayo de mutación TCR en esta nueva evaluación, no realizado inicialmente, se basa en que la mayoría de los linfocitos circulantes en sangre periférica se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, quiescentes. Esto supone que, una vez que se produce una mutación en alguna de las dos cadenas del TCR, a las células mutantes les llevaba algún tiempo perder por completo la expresión en superficie del complejo TCR/CD3; por lo tanto, este test proporciona información acerca de exposiciones ocurridas entre varios meses y varios años atrás (Ishioka *et al.*, 1997). De nuevo, no se observaron diferencias en este ensayo entre el grupo expuesto y el control. Existen antecedentes de resultados similares en otras poblaciones, ya que en un estudio con pacientes de cáncer tratados con radioterapia se vio que la frecuencia de mutación en este receptor descendía gradualmente a niveles basales a lo largo del periodo de 10 años después del tratamiento (Iwamoto *et al.*, 1994; Umeki *et al.*, 1998), y los supervivientes de la bomba atómica de Hiroshima no mostraron elevación significativa en la TCR-Mf varios años después del bombardeo (Kyoizumi *et al.*, 1992). En esta línea, Kyoizumi *et al.* (1992) demostraron que el 90% de las células variantes detectadas en el ensayo no podían ser clonadas y expandidas *in vitro* con lo que, si esto se puede aplicar asimismo *in vivo*, la mayoría de los linfocitos mutantes para el TCR permanecerían en la circulación sanguínea solamente hasta el final de su periodo de vida.

Con respecto a los resultados de la evaluación de los MN, cuando se realizan determinaciones *in vitro* la frecuencia de MN obtenidos a partir del análisis por citometría de flujo concuerda habitualmente con los resultados derivados del recuento microscópico en líneas celulares en proliferación (Kirsch-Volders *et al.*, 2011), y también en linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina (PHA) (Viaggi *et al.*, 1995; Lukamowicz *et al.*, 2011). No obstante, cuando se utiliza para biomonitorización de poblaciones humanas, la información obtenida en la evaluación de los MN por citometría de flujo es comparable a la

proporcionada por la frecuencia de MNMN que se evalúa mediante la técnica de bloqueo de la citocinesis. Esto es así porque la citometría de flujo en estas condiciones se lleva a cabo sin un periodo previo de cultivo en presencia de estimulación con PHA, con lo que se analizan los linfocitos quiescentes directamente extraídos de la muestra de sangre. A pesar de que no se observaron diferencias entre la población expuesta y la control en las frecuencias de BNMN, NPB o NBUD, se obtuvo una tasa significativamente inferior de MNcit en los sujetos expuestos, junto con una disminución no significativa en el parámetro MNMN, lo que refleja el paralelismo entre esas dos variables. La razón para este descenso aparentemente contradictorio en la genotoxicidad relacionado con la exposición en el pasado no está clara, pero quizás la frecuencia de MNcit esté influenciada por factores modificadores adicionales diferentes a los tenidos en cuenta en este estudio (sexo, edad y consumo de tabaco). En este sentido, diversos factores tales como factores dietéticos (niveles endógenos de micronutrientes como folatos, vitamina B12, homocisteína o vitamina C), ejercicio físico, consumo de alcohol y polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo o en procesos de reparación del ADN han demostrado asociación con la frecuencia de MN (revisado en Battershill *et al.*, 2008; Fenech y Bonassi, 2011; Kirsch-Volders *et al.*, 2011). Esta causa puede hacerse probablemente extensible también al inesperado incremento del índice CBPI, que indica una mayor velocidad en el desarrollo del ciclo celular en los linfocitos estimulados *in vitro* con PHA.

En lo que concierne a los factores modificadores que han sido evaluados, los resultados de este estudio muestran una frecuencia de MNcit significativamente más alta en mujeres que en varones. Este efecto del sexo concuerda con lo encontrado en estudios previos (Fenech *et al.*, 1994; Kirsch-Volders *et al.*, 2010), y fue cuantificado como una tasa de MN un 19% más alta en mujeres en un análisis en el que se tuvieron en cuenta datos procedentes de 25 laboratorios diferentes de todo el mundo (Bonassi *et al.*, 2001); este dato resulta muy similar al incremento del 22% observado en el presente trabajo. El aumento de la frecuencia de MN en mujeres puede ser explicado por la mayor tendencia del cromosoma X – del cual las mujeres portan dos copias – en relación a otros cromosomas, a ser perdido e incorporado en MN (Catalán *et al.*, 1995; Surrallés *et al.*, 1996; Norppa y Falck, 2003). Aunque no se ha alcanzado significación estadística, también se han observado frecuencias ligeramente más altas en mujeres para los parámetros BNMN y MNMN.

Asimismo, se encontró un incremento de la TCR-Mf asociado con la edad y el consumo de tabaco. El efecto de la edad es esperable, dado que la eficiencia de los procesos de



reparación del ADN va disminuyendo con la edad, y la frecuencia de mutación se incrementa proporcionalmente al número de divisiones celulares debido a errores asociados al proceso de replicación del ADN. Este efecto de la edad sobre la TCR-Mf se observó también en otras poblaciones con exposición ocupacional a metotrexato (Deng *et al.*, 2005) o plomo (García-Lestón *et al.*, 2011), e incluso se cuantificó como un incremento de  $2 \times 10^{-5}$  en la frecuencia de mutación por cada década de vida (Akiyama *et al.*, 1995). La influencia del tabaco en el TCR-Mf solamente fue evaluada con anterioridad en dos estudios de biomonitorización de personas expuestas ocupacionalmente a medicamentos antineoplásicos (Lanza *et al.*, 1999) y plomo (García-Lestón *et al.*, 2011 y 2012), pero no observaron efecto significativo de ese factor.

Las principales vías de exposición al fuel para los sujetos que participaron en su limpieza fueron la respiratoria y la transdérmica. Aunque en un primer momento tras el accidente no había equipamiento protector disponible, posteriormente se dotó a los individuos con mascarillas para prevenir la exposición inhalatoria, y con guantes, mono y botas para evitar el contacto dérmico con el fuel. En general, todas las personas implicadas en la limpieza usaron botas y guantes, pero solamente algunas de ellas utilizaron mono y mascarilla, y el uso de esta última en algunos casos fue discontinuo (ocasional), debido a la gran incomodidad que suponía. Cuando en nuestro estudio previo se evaluó el posible efecto de la utilización de medidas protectoras sobre los biomarcadores de genotoxicidad analizados, sólo se observaron ligeros incrementos en el daño en el ADN (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008b) y en la frecuencia de SCE (Pérez-Cadahía *et al.*, 2007) en algunos grupos de individuos que no usaron ropas protectoras, no obteniendo ningún efecto del uso de mascarilla. Las razones propuestas para explicar este efecto tan somero fueron que las características del equipamiento protector utilizado no fueron apropiadas para esa exposición en particular, o que los sujetos no lo usaron correctamente probablemente por no haber recibido información suficiente al respecto. De hecho, un estudio realizado por Carrasco *et al.* (2006) en individuos también expuestos al fuel del *Prestige* concluye que recibir información sobre la protección de la salud se asoció al uso de dispositivos protectores, y que los sujetos no informados registraron un exceso de riesgo significativo de presentar sintomatología aguda diversa como picor de ojos, náuseas, vómitos, mareos, dolores de cabeza y garganta, y problemas respiratorios. En otro estudio posterior realizado por Lee *et al.* (2009) tras el vertido del *Hebei Spirit* (Corea, 2007) se mostró que los residentes y voluntarios que no utilizaron mascarilla presentaron mayores niveles de fatiga y fiebre, y las concentraciones de mercurio en orina fueron significativamente superiores en los que no usaron ropa y botas adecuadas.

En el presente estudio evaluamos de nuevo el efecto de la utilización de esas medidas de protección individual, así como del tiempo de exposición, pues para muchos individuos la exposición al fuel se prolongó hasta 10 meses. No se observó influencia del tiempo de exposición ni incremento de ninguno de los parámetros de genotoxicidad relacionado con la ausencia de uso de equipamiento protector. Sin embargo, se obtuvieron descensos en el ensayo del cometa y la frecuencia de NPB asociados con la ausencia de su uso, probablemente relacionados también con la existencia de diferentes factores modificadores.

En resumen, los resultados de genotoxicidad no muestran evidencia alguna de la persistencia de daño genotóxico en población expuesta al fuel del *Prestige* siete años más tarde. Sin embargo, el hecho de que el riesgo genotóxico se incrementase en el momento de la exposición y al menos durante dos años más, debe ser cuidadosamente considerado para establecer la necesidad de programar estudios de biomonitorización en las poblaciones que participen en las actividades de limpieza en caso de que ocurra un nuevo vertido.

## 2. TOXICIDAD ENDOCRINA

El fuel pesado, como el que transportaba el buque *Prestige*, está formado por una compleja mezcla de sustancias, entre las cuales se encuentran diversos metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos con reconocidas capacidades de disrupción endocrina (revisado en De coster y Van Larebeke, 2012). Sin embargo, hasta el accidente del *Prestige* no se había realizado ningún estudio centrado en la determinación de biomarcadores de toxicidad endocrina en poblaciones expuestas al fuel.

Se considera que las alteraciones en los niveles de las hormonas prolactina y cortisol reflejan procesos de estrés psicofisiológico (Sobrinho, 2003; Dahlgren *et al.*, 2005). Además, la prolactina ha sido propuesta también como un biomarcador de efecto neuroendocrino en poblaciones expuestas a contaminantes, ya que refleja función central dopaminérgica (Catalani *et al.*, 2012). En nuestro anterior estudio, estos dos parámetros endocrinos fueron evaluados en muestras de sangre de individuos expuestos al fuel del *Prestige* en el momento de la exposición, encontrándose descensos en el cortisol en todos los grupos expuestos en comparación con los controles, lo que incluía tanto a los voluntarios expuestos por un corto periodo de tiempo (5 días) como a los trabajadores expuestos varios meses. También se observó descenso significativo en los niveles de prolactina únicamente en el grupo de trabajadores que usaron máquinas hidrolimpiadoras para limpiar las rocas (Pérez- Cadahía *et al.*, 2007). En el mismo estudio, al incrementar el tamaño de la muestra de 60 a 180 individuos

expuestos, los resultados mostraron descenso significativo en el cortisol sólo en individuos que manejaban hidrolimpiadoras, pero no se vio alteración en la prolactina relacionada con la exposición (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a). La conveniencia de realizar estudios de seguimiento a largo plazo tras derrames de petróleo para evaluar los procesos de disrupción endocrina en humanos y ecosistemas fue apuntada por Ji *et al.* (2011), ya que observaron esa capacidad en sedimentos recolectados del vertido del *Hebei Spirit* (Corea del Sur, 2007) dos años después del accidente de este petrolero.

En esta nueva evaluación de los mismos biomarcadores endocrinos llevada a cabo siete años después de la exposición al fuel del *Prestige*, las diferencias significativas en los individuos expuestos frente a los controles sólo se observaron en el cortisol, ya que sus niveles se mostraron superiores en expuestos. El incremento del cortisol en los individuos expuestos, que contrasta con el descenso detectado inicialmente, sugiere la existencia de alteración en el sistema endocrino relacionado con la exposición pasada al fuel.

De igual manera, se han detectado con anterioridad niveles significativamente elevados de cortisol en plasma en trabajadores al aire libre (policías municipales) expuestos crónicamente a la contaminación urbana, que comparte en su composición varias sustancias con el fuel (Tomei *et al.*, 2003; Rosati *et al.*, 2011), y se ha establecido que un incremento crónico en la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal – y el consiguiente incremento en la concentración de cortisol – se encuentra asociado con un pronóstico negativo general para la salud (Rosati *et al.*, 2011). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aparte de por la exposición, los niveles de cortisol pueden estar influenciados por una gran variedad de factores, incluyendo principalmente los ritmos circadianos pero también factores genéticos y ambientales (Franz *et al.*, 2010). Por otra parte, también debe ser tomado en consideración el hecho de que la diferencia entre controles y expuestos pueda derivar de alguna exposición ocupacional inherente al trabajo de pescador/mariscador, ya que todos los expuestos se dedicaban a esta ocupación, mientras que todos los controles trabajaban en escuelas o en la universidad. No obstante, los valores obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro del rango de referencia para sujetos sanos tanto en los controles como en los expuestos (60-250ng/ml).

Cuando analizamos la influencia de factores fisiológicos y de estilo de vida (sexo, edad y consumo de tabaco) sobre los biomarcadores endocrinos determinados, únicamente se encontró un suave descenso de la prolactina con la edad. Generalmente los niveles de

prolactina suelen ser ligeramente superiores en mujeres que en varones (rangos de referencia 2-18 ng/ml para varones y 2-29 ng/ml para mujeres no embarazadas). Los valores similares obtenidos en ambos sexos probablemente se relacionan con la existencia de un pico característico en el nivel de esta hormona en los varones a primera hora de la mañana, momento en el que se tomaron las muestras, tal como se ha descrito previamente en ratas (Lafuente *et al.*, 2004).

En cuanto al consumo de tabaco varios estudios han demostrado, a diferencia de nuestros resultados, que ejerce influencia sobre la regulación hormonal de la prolactina (Xue *et al.*, 2010), pero el mecanismo de esta relación parece ser complejo. Existen trabajos que sugieren que fumar incrementa los niveles de prolactina (Kirschbaum *et al.*, 1994; Mendelson *et al.*, 2003), mientras que otros observaron menor respuesta de esta hormona en fumadores que en no fumadores (Corona *et al.*, 2005; Trummer *et al.*, 2002). Por otra parte, el consumo de tabaco activa el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, estimula la secreción de hormona adrenocorticotropa e incrementa el efecto de ésta sobre la corteza adrenal, lo que resulta en la estimulación de la secreción de cortisol (Hruškovičová *et al.*, 2013), por lo que en fumadores se suelen observar niveles basales de cortisol más elevados que en no fumadores (Rohleder y Kirschbaum, 2006; Steptoe y Ussher, 2006). No obstante, no fue éste el caso de nuestro estudio pues el consumo de tabaco no afectó a la concentración sérica de cortisol.

En resumen, estos resultados muestran que los valores de la hormona prolactina en la población expuesta no son diferentes de los valores control. Sin embargo, se observaron alteraciones en el nivel de cortisol que sugieren la necesidad de realizar un seguimiento de estos individuos para la detección temprana de problemas de salud que pudieran estar relacionados con el sistema endocrino.

### **3. INMUNOTOXICIDAD**

Los cambios en las células inmunitarias son indicadores importantes de la respuesta sistémica del organismo ante la polución ambiental (Dutta *et al.*, 2012). Existen evidencias que relacionan esos cambios con la exposición a componentes inmunotóxicos y, a su vez, con alteraciones de la respuesta inmune (Tulinska *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005). Es por ello que en este trabajo se han utilizado los análisis de las principales subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup>, linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, linfocitos B CD19<sup>+</sup> y células NK CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) como biomarcadores de toxicidad inmunológica.

Además, se han evaluado las concentraciones de ciertas citoquinas circulantes en plasma, ya que son moléculas directamente implicadas no sólo en el desarrollo de las respuestas inmunes, sino también en la comunicación y coordinación del sistema inmunológico con el sistema endocrino y nervioso. Se han determinado seis citoquinas: la IL2, el TNF $\alpha$  y el IFN $\gamma$ , que participan en las respuestas inmunes de tipo Th<sub>1</sub>, y la IL4, la IL6 y la IL10, que participan en las respuestas inmunes de tipo Th<sub>2</sub>. Para realizar los análisis se utilizó una metodología simultánea de citometría de flujo porque presenta una serie de ventajas frente al ensayo ELISA convencional. Mediante la citometría de flujo se obtiene una menor variabilidad intra- e inter-ensayo que con el ELISA al cuantificar todas las citoquinas en la misma muestra, se necesita un volumen de plasma mucho menor y, por consiguiente, una cantidad inferior de muestra de sangre que se debe extraer de los individuos, supone un importante ahorro de tiempo y, además, se obtiene una gran cantidad de datos en cada ensayo, aportando elevada potencia estadística a los resultados generados.

El triptófano es un aminoácido proteínogénico esencial y un precursor de ciertos neurotransmisores, que se degrada por las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) para formar kinurenina. Esta última enzima es estimulada por el IFN $\gamma$  (Taylor y Feng, 1991). La estimulación del IFN $\gamma$  está también involucrada en la producción de neopterina por la enzima GTP-ciclohidrolasa I a partir del GTP por los monocitos y macrófagos (Schroecksnadel *et al.*, 2010). Así, la concentración de neopterina en los fluidos corporales constituye un importante marcador de la activación del sistema inmune, específicamente de la respuesta inmune celular o mediada por Th<sub>1</sub>. Las concentraciones de neopterina se incrementan en procesos infecciosos, autoinmunes, cardiovasculares y neurodegenerativos, tumores malignos y durante episodios de rechazo en transplantes (revisado en Murr *et al.*, 2002). El espectro de patologías en las cuales se ha descrito incremento de la degradación del triptófano es muy similar al de las que cursan con incremento de la producción de neopterina (revisado en Murr *et al.*, 2002 y Schroecksnadel *et al.*, 2006). De hecho, se ha encontrado una fuerte asociación entre la concentración de neopterina y la tasa de degradación del triptófano (Kin/Trp) (Schroecksnadel *et al.*, 2006). Tanto las concentraciones séricas de la neopterina como la extensión de la degradación del triptófano se han utilizado como biomarcadores de inmunotoxicidad en exposiciones ocupacionales a diferentes agentes químicos como la sílice (Altindag *et al.*, 2003), el aluminio (Baydar *et al.*, 2005), las radiaciones ionizantes (Engin *et al.*, 2005), el plomo (Engin *et al.*, 2006; García-Lestón *et al.*, 2012) y el zinc (Sarac *et al.*, 2013).

El potencial inmunotóxico de muchos de los compuestos químicos presentes en el fuel es bien conocido. A modo de ejemplo, Veraldi *et al.* (2006) revisaron los efectos inmunotóxicos de diferentes sustancias utilizadas habitualmente en ambientes ocupacionales, teniendo en cuenta el tipo de inmunotoxicidad y el valor de las evidencias disponibles, y encontraron claras evidencias de actividad inmunosupresora para el benceno y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, clasificando su potencial como “fuerte”. Sin embargo, y al igual que en el caso de los marcadores endocrinos, hasta el momento del accidente del *Prestige* tampoco habían sido evaluados nunca los biomarcadores de toxicidad inmunológica en las poblaciones expuestas a vertidos de petróleo.

Gestal *et al.* (2004) observaron inicialmente en individuos involucrados en la limpieza del fuel del *Prestige* descensos significativos en los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, e incrementos en las células CD8<sup>+</sup> y las concentraciones plasmáticas de las citoquinas IL2, IL4, IL10 e IFN $\gamma$ , sin alteraciones en los linfocitos CD19<sup>+</sup> ni en los niveles de IL6 y TNF $\alpha$ , aunque todos los valores obtenidos se encontraron dentro de los correspondientes rangos de referencia. Tras el vertido provocado por el accidente de la plataforma *Deepwater Horizon* (Golfo de México, 2010), un estudio *in vivo* en modelos de roedores mostró la capacidad sensibilizadora del COREXIT 9500A, el principal dispersante utilizado para hacer frente a dicho vertido (Anderson *et al.*, 2011). No obstante, los dispersantes no se usaron en la mayoría de los grandes vertidos previos, ni tampoco en el caso del *Prestige*.

En esta nueva evaluación de biomarcadores inmunológicos llevada a cabo siete años después de la exposición al fuel del *Prestige*, se observaron descensos significativos en los niveles de kinurenina y los linfocitos CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> en los individuos expuestos frente a los controles, tal y como se ha expuesto anteriormente, pero no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los parámetros inmunológicos que inicialmente se habían mostrado alterados en los individuos expuestos al fuel del *Prestige* (subpoblaciones linfocitarias y citoquinas circulantes) (Gestal *et al.*, 2004). La única subpoblación que resultó modificada de forma significativa fue el porcentaje de las células CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, no evaluado en trabajos previos. Las células NK (CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) son linfocitos efectores del sistema inmune innato que controlan varios tipos de tumores e infecciones microbianas limitando su diseminación, y con ello los consiguientes daños en los tejidos, y están también involucrados en las interacciones recíprocas con células dendríticas, macrófagos, linfocitos T y células endoteliales (revisado en Vivier *et al.*, 2008). Dado que la hormona cortisol suprime la respuesta inmune,

puede ser que la disminución en el %CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> observada en el grupo expuesto sea una consecuencia indirecta del aumento en el cortisol en estos individuos. El descenso del porcentaje de estas células CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> en los expuestos, aunque situado dentro del rango de referencia (4-28%), puede tener serias consecuencias, ya que esas células constituyen una importante defensa contra las infecciones virales y son el principal tipo celular involucrado en la vigilancia inmune frente a células neoplásicas. En humanos, la incidencia de cánceres de tipo viral, como el nasofaríngeo y posiblemente algunos linfomas causados por el virus Epstein-Barr, se ve incrementada en individuos inmunosuprimidos, hipotéticamente debido a que en esos individuos disminuye la capacidad para protegerse frente a infecciones por el descenso de linfocitos, como las células T y las NK (Boshoff y Weiss, 2002; Pattle y Farrel, 2006). Estudios previos también han descrito descensos en la cantidad o función de las células NK relacionados con exposiciones similares a la de este trabajo. Moszczynski *et al.* (1996) mostraron que el número de células NK se redujo en varones expuestos a solventes orgánicos, incluyendo benceno, tolueno y xileno; Bulog *et al.* (2011) describieron descenso en la citotoxicidad mediada por células NK en individuos de una zona industrial expuestos a contaminación ambiental, y De Celis *et al.* (2008) observaron disminución significativa en la expresión de receptores de activación de células NK en mujeres trabajadoras de una fábrica de reactivos químicos expuestas a compuestos orgánicos volátiles, entre los cuales se encontraban benceno, etilbenceno, tolueno y xileno entre ellos.

Por otra parte, a pesar de que nuestros resultados confirman la fuerte asociación que existe entre la neopterina y el proceso de degradación del triptófano descrita previamente (Schroecksnadel *et al.*, 2006), puesto que se obtuvieron correlaciones significativas de la neopterina con el triptófano (inversa), la kinurenina y la ratio Kin/Trp (ambas positivas), la ligera disminución en la concentración de kinurenina en el grupo de expuestos ( $P=0.039$ ) no estuvo acompañada por un incremento en el nivel de triptófano, o por descensos similares en la tasa Kin/Trp y las concentraciones de neopterina e IFN $\gamma$ . Es por ello que consideramos que la relevancia de este hallazgo es limitada.

Los factores de confusión analizados (sexo, edad y consumo de tabaco) ejercieron influencia sobre algunos de los biomarcadores de inmunotoxicidad evaluados. El sexo influyó significativamente sobre el triptófano, los porcentajes de las células CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, la tasa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y el IFN $\gamma$ ; todos estos parámetros excepto el triptófano y las células CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> fueron más elevados en mujeres que en varones. Los resultados observados en las subpoblaciones linfocitarias apoyan otros estudios previos en individuos españoles e italianos,

en los que se obtuvieron de forma consistente valores de %CD4<sup>+</sup> mayores y de %CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> menores en mujeres (Santagostino *et al.*, 1999; Andreu-Ballester *et al.*, 2012; García Dabrio *et al.*, 2012).

Respecto a la edad, uno de los cambios más importantes asociados al envejecimiento es el descenso en la inmunocompetencia. Esto puede acarrear el desarrollo de infecciones o enfermedades autoinmunes y estar involucrado en la patogénesis de varios desórdenes relacionados con la edad, como las enfermedades cardiovasculares o las neurodegenerativas (Wick *et al.*, 1997). Aunque se han descrito con anterioridad cambios en las subpoblaciones de linfocitos con la edad, en concreto aumento de %CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y descenso de %CD19<sup>+</sup> (García-Dabrio *et al.*, 2012), y alteraciones en la producción de citoquinas en ancianos (revisado en Rink *et al.*, 1998), en este estudio no se encontró ninguno de estos cambios. Una posible explicación para la ausencia de influencia de la edad sobre estos parámetros es el hecho de que la mayoría de los sujetos analizados eran bastante jóvenes, ya que muy pocos superaban los 60 años. De igual forma, Santagostino *et al.* (1999) tampoco observaron ningún efecto de la edad sobre las subpoblaciones linfocitarias analizando un grupo de 968 individuos con edades comprendidas entre los 18 y los 70 años.

Por otra parte, el incremento observado en la producción de neopterina a medida que se incrementa la edad se encuentra ampliamente documentado (Murr *et al.*, 2002; Frick *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2010; García-Lestón *et al.*, 2012), sugiriendo que el envejecimiento en personas sanas se relaciona con un proceso de activación inmune que puede no ser detectable clínicamente, pero que también puede conducir al desarrollo de patologías asociadas al envejecimiento como la aterosclerosis o la demencia.

En cuanto al hábito de fumar, se ha demostrado que éste altera los niveles de diferentes subpoblaciones linfocitarias, frecuentemente incrementándolas (Santagostino *et al.*, 1999; García-Dabrio *et al.*, 2012; Jubri *et al.*, 2013) y de neopterina (Diamondstone *et al.*, 1994; Schennach *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2003). Sin embargo, la influencia del tabaco sobre esos parámetros tampoco fue detectada en este estudio, probablemente debido al bajo número de individuos fumadores incluidos (10 controles y 17 expuestos).

El tiempo de exposición al fuel o el uso de ropas protectoras no influenciaron los resultados de los parámetros inmunológicos. No obstante, sí se observó una clara influencia del uso de mascarilla en la neopterina, %CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e IL4. Estas asociaciones están apoyadas por el hecho de que estos biomarcadores actúan en el marco del mismo mecanismo:



la activación inmune de tipo Th<sub>2</sub>. *In vitro* se ha observado que no sólo el IFN $\gamma$ , citoquina de tipo Th<sub>1</sub>, estimula la producción de neopterin en las células mononucleares de sangre periférica, sino que también la citoquina IL4, de tipo Th<sub>2</sub>, es capaz de contrarrestar dicho proceso (Weiss *et al.*, 1999). Así, el incremento en la concentración de IL4 junto con el descenso en la de neopterin apuntan a una influencia que estimula la respuesta Th<sub>2</sub> (humoral) e inhibe la Th<sub>1</sub> (celular) en los individuos que no usaron mascarilla y estuvieron, por tanto, expuestos más intensamente a los contaminantes del fuel. Este hecho también se apoya en la observación *in vitro* de que los compuestos antioxidantes suprimen la respuesta inmune de tipo Th<sub>1</sub> (Jenny *et al.*, 2011); los hidrocarburos ricos en electrones del aceite mineral puede considerarse que pertenecen al grupo de antioxidantes más que al de prooxidantes. Por otra parte, un incremento en la exposición a compuestos antioxidantes no solamente deprime los mecanismos de inmunovigilancia sino que además parece estar asociado con un incremento de riesgo de desarrollo de alergia (Zaknun *et al.*, 2012). Pero, de nuevo, la validez de esos resultados se encuentra limitada por el relativamente pequeño número de individuos incluidos en cada grupo de análisis. Además, también se debe tener en cuenta la posible existencia de sesgos de información, debido al largo tiempo transcurrido entre la participación en la limpieza del vertido y la recogida de los datos mediante las encuestas.

En resumen, nuestros resultados muestran que la mayoría de parámetros inmunológicos analizados en la población expuesta no fueron diferentes de los valores control. Sin embargo, se observaron alteraciones en la kinurenina y las células NK que hacen recomendable realizar un seguimiento temporal del estado inmunológico de estos individuos.

#### 4. SINTOMATOLOGÍA

Con respecto a la sintomatología relacionada con la exposición, el efecto más común en la salud humana asociado con la exposición crónica o repetida al fuel es la dermatitis (Laffon, 2013), en el caso de que exista contacto con la piel. Los pescadores españoles que participaron en la limpieza del vertido del *Prestige*, cuya vía de exposición principal fue la inhalatoria, presentaron una elevada prevalencia de síntomas respiratorios (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010), y Zock *et al.* (2012) demostraron la persistencia de esos síntomas cinco años después de la exposición, relacionados con el grado de exposición experimentado durante la limpieza. Además de esto Sabucedo *et al.* (2010), evaluando la salud mental y la capacidad funcional de los individuos expuestos al fuel del *Prestige*, encontraron niveles más bajos de salud mental en la población afectada un año después de la exposición. Nuestros resultados,

aunque están sólo basados en un cuestionario sencillo y un tamaño poblacional limitado, muestran elevada prevalencia de síntomas respiratorios, dermatológicos y especialmente psico-neurológicos. Parecen por tanto refrendar la persistencia de esos síntomas siete años después de la exposición, pero son necesarios más estudios que corroboren esta apreciación.

Sin embargo, resulta interesante la observación de altos niveles de neopterina asociados con la presencia de síntomas psico-neurológicos, pues se ha demostrado previamente el incremento de la producción de neopterina en pacientes con depresión y la relación existente entre los niveles de esta sustancia y la presencia de síntomas depresivos (Maes *et al.*, 1993; Widner *et al.*, 2002). La asociación entre las concentraciones de neopterina alteradas y el estado psico-neurológico ya fue observada anteriormente en varias condiciones clínicas, incluyendo infecciones y cáncer. No obstante, habitualmente se trata de una consecuencia de las alteraciones bioquímicas derivadas del estado inmune patológico crónico de dichos pacientes, que puede alterar el metabolismo de los neurotransmisores interfiriendo intensamente con la bioquímica del triptófano y la tirosina (Widner *et al.*, 2002; Capuron *et al.*, 2011). Pero por el momento no existen pruebas de la existencia de un papel directo de la neopterina sobre los procesos depresivos. Por otra parte, la mayor prevalencia de síntomas psico-neurológicos en mujeres ha sido ampliamente descrita con anterioridad (Kessler, 2003; Fernández-Guasti *et al.*, 2012; Valentino *et al.*, 2012).

*Conclusiones*

---



## CONCLUSIONES

A partir del análisis de los resultados obtenidos en la realización de este estudio se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Los individuos expuestos al fuel vertido por el buque *Prestige* durante las labores de limpieza no mostraron incrementos significativos en el nivel del daño primario en el ADN, el daño citogenético o la mutagenicidad, respecto a una población control de características similares, tras siete años de la exposición. Por tanto, por los datos obtenidos, los daños genotóxicos detectados en el momento de la exposición y, al menos, dos años después, han retornado a los niveles basales.
2. Los niveles séricos de prolactina fueron similares en el grupo expuesto y el control, pero la concentración de cortisol fue significativamente superior en los individuos expuestos, aunque se mantuvo dentro del rango de referencia.
3. No se observaron alteraciones en los porcentajes de la mayoría de subpoblaciones linfocitarias ni en las concentraciones circulantes de citoquinas, neopterina o triptófano en la población expuesta. Sin embargo, los niveles de kinurenina y del porcentaje de células NK fueron significativamente inferiores en los sujetos de esta población respecto a los controles, manteniéndose dentro del rango de referencia.
4. Las influencias más notables de factores fisiológicos y de estilo de vida encontradas incluyen daño citogenético, porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> y tasa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> superiores en mujeres que en varones, porcentaje de células CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> superior en varones, asociación de la edad con la mutagenicidad y la neopterina, y del consumo de tabaco con la mutagenicidad.
5. El tiempo de exposición al fuel no influyó sobre los parámetros evaluados. La ausencia de uso de mascarilla se relacionó con descenso de NPB, de neopterina y de la tasa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, así como con un aumento de %CD8<sup>+</sup> y de IL4, y la ausencia de uso de mono protector se asoció con descenso del %TDNA y de NPB.
6. La población expuesta mostró elevada prevalencia de síntomas respiratorios, dermatológicos y especialmente psico-neurológicos, aunque los datos se basan en un cuestionario sencillo y un tamaño poblacional limitado.

7. Las alteraciones hormonales e inmunológicas observadas sugieren la necesidad de realizar un seguimiento de estos individuos para la detección temprana de problemas de salud que pudieran estar relacionados con el sistema endocrino o inmunológico.

## *Bibliografía*

---





**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas AK, Lichtman AH. Células y tejidos del sistema inmunitario. *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición. Elsevier. Madrid. 2004; 16-39.
- Abramson D. Impact on children and families of the deepwater Horizon oil spill. *NCDP Research Brief*. 2010; 8: 1-19.
- Aguilera F, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *J. Appl. Toxicol*. 2010; 30: 291-301.
- Akiyama M, Kyoizumi S, Hirai Y, Kusunoki Y, Iwamoto KS, Nakamura N. Mutation frequency in human blood cells increases with age. *Mutat. Res*. 1995; 338: 141-149.
- Albaigès J, Morales-Nin B, Vilas F. The *Prestige* oil spill: A scientific response. *Marine Pollut. Bull*. 2006; 53: 205-207.
- Altindag ZZ, Baydar T, Isimer A, Sahin G. Neopterin as a new biomarker for the evaluation of occupational exposure to silica. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 2003; 76: 318-322.
- Amat-Bronnert A, Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. Genotoxic activity and induction of biotransformation enzymes in two human cell lines after treatment by Erika fuel extract. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2007; 23: 89-95.
- Anderson D, Yu T-W, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat. Res*. 1994; 307: 261-271.
- Anderson SE, Franko J, Lukomska E, Meade BJ. Potential immunotoxicological health effects following exposure to corexit 9500a during cleanup of the deepwater horizon oil spill. *J. Toxicol. Environ. Health*. 2011; 74: 1419-1430.
- Andreu-Ballester JC, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V, Almela-Quilis A, Mayans J, Ballester F. Values for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: Assessment by age and gender. *Cytometry B: Clin Cytometry* 2012; 82B: 238-244.
- Arafa SA, AboEl-Ela MM, Kassem HSh, Mahmoud SS, Zaki EI. Study of the genotoxic effect of cyclophosphamide on albino mice bone marrow polychromatic erythrocytes and the protective effect of captopril. *Bulletin of Alexandria Faculty of Medicine*. 2008; 44: 4.
- Asci A, Baydar T, Cetinkaya R, Dolgun A, Sahin G. Evaluation of neopterin levels in patients undergoing hemodialysis. *Hemodial. Int*. 2010; 14: 240-246.
- Baars BJ. The wreckage of the oil tanker "Erika" human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. *Toxicol. Lett*. 2002; 128: 55-68.

- Barile FA. *Principles of toxicology testing*. CRC Press. Boca Raton-London-New York. 2008.
- Battershill JM, Burnett K, Bull S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis*. 2008; 23: 423-437.
- Baydar T, Engin A, Aydin A, Sahin G. Effect of aluminum exposure on pteridine metabolism. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005; 106: 153-164.
- Biró A, Pállinger E, Major J, Jakab MG, Klupp T, Falus A, Tompa A. Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol. Lett.* 2002; 81: 133-140.
- Bohannon J, Bosh X. Spanish researchers vent anger over handling of oil spill. *Science*. 2003; 299: 490.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarfi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 37: 31-45.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 625-631.
- Borgert ER, Roberts SM, James RC, Harbison RD. *Health Risk Assessment: Dermal and Inhalation Exposure and Absorption of Toxicants*. Wang RGM, Knaak JB, Maibach HI (Eds.). CRC Press. Boca Raton- Florida. 1993; 455-470.
- Boscolo P, Bergamaschi A, Di Sciascio MB, Benvenuti F, Reale M, Di Stefano F, Conti P, Di Gioacchino M. Effects of low frequency electromagnetic fields on expression of lymphocyte subsets and production of cytokines of men and women employed in a museum. *Sci. Total Environ.* 2001; 270: 13-20.
- Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; 2:373–382.
- Bro-Rasmussen F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. *Sci. Total Environ.* 1996; 188: 45-60.

- Bulog A, Karaconji IB, Sutić I, Mićović V. Immunomodulation of cell-mediated cytotoxicity after chronic exposure to vapors. *Col. Antropol.* 2011; 35: 61-64.
- Buttke D, Vagi S, Schnall A, Bayleyegn T, Morrison M, Allen M, Wolkin A. Community Assessment for Public Health Emergency Response (CASPER) one year following the gulf coast oil spill: Alabama y Mississippi, 2011. *Prehosp. Disaster Med.* 2012; 27: 1-7.
- Campbell D, Cox D, Crum J, Foster k, Christie P, Brewster D. Initial effects of the grounding of the tanker Braer on health in Shetland. *BMJ.* 1993; 307: 1251-1255.
- Campbell D, Cox D, Crum J, Foster K, Rille A. Later effects of grounding of tanker Braer on health in Shetland. *BMJ.* 1994; 309: 773-774.
- Capuron L, Schroecksadel S, Féart C, Aubert A, Higuieret D, Barberger-Gateau P, Layé S, Fuchs D. Chronic low-grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: Role in neuropsychiatric symptoms. *Biol. Psychiat.* 2011; 70: 175-182.
- Carrasco J, Lope V, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Suárez B, López-Abente G, Rodríguez-Artalejo F, Pollan M. 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.* 2006; 6: 1-9.
- Carrasco J, Perez-Gomez B, Garcia-Mendizabal M, Lope V, Aragonés N, Forjaz M, Guallar-Castillon P, Lopez-Abente G, Rodriguez-Artalejo F, Pollan M. Health-related quality of life and mental health in the medium-term aftermath of the *Prestige* oil spill in Galicia (Spain): A cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2007; 7: 245.
- Catalán J, Autio K, Wessman M, Lindholm C, Knuutila S, Sorsa M, Norppa H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet. Cell Genet.* 1995; 68: 11-16.
- Catalani S, De Palma G, Tomasi C, Alinovi R, Mutti A, Apostoli P. Lack of correlation between blood lead and serum prolactin levels among lead exposed workers. *Biomarkers.* 2012; 17: 513-519.
- Cebulska-Wasilewska, A. Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. *Mutat. Res.* 2003; 544: 289-297.
- Chan NLS, Wang H, Wang Y, Leung HY, Leung LK. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced CYP1B1 activity is suppressed by perillyl alcohol in MCF-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; 213: 98-104.
- Chaty S, Rodius F, Lanhers M-C, Burnel D, Vasseur P. Induction of CYP1A1 in rat liver after ingestion of mussels contaminated by Erika fuel oils. *Arch. Toxicol.* 2008; 82: 75-80.

- Cheong H, Ha M, Lee J S, Kwon H, Ha E, Hong Y, Choi Y, Jeong W, Hur J, Lee S, Kim E, Im H. Hebei Spirit oil exposure and subjective symptoms in residents participating in clean-up activities. *Environ. Health Toxicol.* 2011; 26: e2011007.
- Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* 1988; 6: 629-662.
- Cole J, Beare DM, Waugh APW, Capulas E, Aldridge KE, Arlett CF, Green MHL, Crum JE, Cox D, Garner RC, Dingley KH, Martin EA, Podmore K, Heydon R, Farmer PB. Biomonitoring of possible human exposure to environmental genotoxic chemicals: Lessons from a study following the wreck of the oil tanker Braer. *Environ. Mol. Mutagen.* 1997; 30: 97-111.
- Collins A. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 249-261.
- COPE (Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia). Cytokine concentrations in biological fluids. 2011. Fecha de última consulta: 2 de abril de 2013. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Cytokine%20Concentrations%20in%20Biological%20Fluids>.
- Corona G, Mannucci E, Petrone L, Ricca V, Mansani R, Cilotti A, Balercia G, Chiarini V, Giommi R, Forti G, Maggi M. Psychobiological correlates of smoking in patients with erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 2005; 17: 527-534.
- Crum J. Peak expiratory flow rate in schoolchildren living close to Braer oil spill. *BMJ.* 1993; 307: 23.
- CSIC (Centro Superior de Investigaciones Científicas). Caracterización del vertido y evolución preliminar en el medio. CSIC Informe técnico N° 01. 2003a. Fecha de última consulta: 2 de abril de 2013. <http://csicPrestige.iim.csic.es/desarro/informcsic/1/index.htm>.
- CSIC (Centro Superior de Investigaciones Científicas). Presencia de metales pesados en la zona del hundimiento del petrolero *Prestige* y composición de metales y complejantes del fuel emulsionado de la costa. CSIC Informe técnico N° 02. 2003b. Fecha de última consulta: 2 de abril de 2013. <http://csicPrestige.iim.csic.es/desarro/informcsic/2/index.htm>.
- Dahlgren A, Kecklund G, Akerstedt T. Different levels of work-related stress and the effects on sleep, fatigue and cortisol. *Scand J. Work Environ. Health.* 2005; 31: 277-285.
- De Celis R, Feria-Velasco A, Bravo-Cuellar A, Hicks-Gómez JJ, García-Iglesias T, Preciado-Martínez V, Muñoz-Islas L, González-Unzaga M. Expression of NK cells activation receptors after occupational exposure to toxics: a preliminary study. *Immunol. Lett.* 2008; 118: 125-131.
- De Coster S, Van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *J. Environ. Pub. Health.* 2012; 52.

- Decordier I, Mateuca R, Kirsch-Volders M. Micronucleus assay and labeling of centromeres with FISH technique. *Drug safety evaluation: methods and protocols*. Springer. 2011; 115-136.
- Decordier I, Mateuca R, Kirsch-Volders M. Micronucleus assay and labeling of centromeres with FISH technique. *Methods Mol. Biol.* 2011; 691: 115-136.
- Deng H, Zhang M, He J, Wu W, Jin L, Zheng W, Lou J, Wang B. Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points, *Mutagenesis*. 2005; 20: 351-357.
- Descotes J. Classification of immunotoxicants. *Immunotoxicology of drugs and chemicals: an experimental approach. Volume I: Principles and methods of immunotoxicology*. Elsevier. Ámsterdam. 2004; 379-385.
- Diamondstone LS, Tollerud DJ, Fuchs D, Wachter H, Brown LM, Maloney E, Kurman CC, Nelson DL, Blattner WA. Factors influencing serum neopterin and  $\beta$ 2-microglobulin levels in a healthy diverse population. *J. Clin. Immunol.* 1994; 14: 368-374.
- Dor F, Bonnard R, Gourier-Frèry C, Cicoella A, Dujardin R, Zmirou D. Health risk assessment after decontamination of the beaches polluted by the wrecked ERIKA tanker. *Risk Anal.* 2003; 23: 1199-1208.
- Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008; 23: 191-205.
- Dutta A, Bhattacharya P, Lahiri T, Ray MR. Immune cells and cardiovascular health in premenopausal women of rural india chronically exposed to biomass smoke during daily household cooking. *Sci. Total Environ.* 2012; 438: 293-298.
- Engin AB, Ergun MA, Yurtcu E, Kan D, Sahin G. Effect of ionizing radiation on the pteridine metabolic pathway and evaluation of its cytotoxicity in exposed hospital staff. *Mutat. Res.* 2005; 585: 184-192.
- Engin AB, Tuzun D, Sahin G. Evaluation of pteridine metabolism in battery workers chronically exposed to lead. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006; 25: 353-359.
- Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26: 43-49.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 2003; 534: 65-75.

- Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 1985; 147: 29-36.
- Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat. Res.* 1994; 313: 203-207.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protocols.* 2007; 2: 1084-1104.
- Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 1993; 285: 35-44.
- Fernández-Guasti A, Fiedler JL, Herrera L, Handa RJ. Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Horm. Metab. Res.* 2012; 44: 607-618.
- Flórez J. Farmacología humana. Masson-Salvat Medicina. 2ª edición. Barcelona. 1992.
- Franz C, York T, Eaves L, Mendoza S, Hauger R, Hellhammer D, Jacobson K, Levine S, Lupien S, Lyons M, Prom-Wormley E, Xian H, Kremen W. Genetic and environmental influences on cortisol regulation across days and contexts in middle-aged men. *Behav. Genet.* 2010; 40: 467-479.
- Frick B, Schroecksnadel K, Neurauter G, Leblhuber F, Fuchs D. Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 684-687.
- Gallacher J, Bronstering K, Palmer S, Fone D, Lyons R. Symptomatology attributable to psychological exposure to a chemical incident: a natural experiment. *J. Epidemiol. Commun. H.* 2007; 61: 506-512.
- García-Dabrio MC, Pujol-Moix N, Martínez-Pérez A, Fontcuberta J, Souto JC, Soria JM, Nomdedéu JF. Influence of age, gender and lifestyle in lymphocyte subsets: Report from the Spanish GAIT-2 study. *Acta Haematol.* 2012; 127: 244-249.
- García-Lestón J, Roma-Torres J, Mayan O, Schroecksnadel S, Fuchs D, Moreira A, Pásaro E, Méndez J, Teixeira JP, Laffon B. Assessment of immunotoxicity parameters in individuals occupationally exposed to lead. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2012; 75: 807-818.
- García-Lestón J, Roma-Torres J, Vilares M, Pinto R, Cunha LM, Prista J, Teixeira JP, Mayan O, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Biomonitoring of a population of Portuguese workers exposed to lead. *Mutat. Res.* 2011; 721: 81-88.
- García-Lestón J, Roma-Torres J, Vilares M, Pinto R, Prista J, Teixeira J P, Mayan O, Conde J, Pingarilho M, Gaspar J F, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environ. Int.* 2012; 43: 29-36.

- Gerhard I, Waibel S, Daniel V, Runnebaum B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. *Hum. Reprod. Update*. 1998; 4: 301-309.
- Gestal JJ, Smyth E, Figueiras A, Montes A, Méndez J, Laffon B, Lafuente MA, Urbietta MT. *Recollida e limpeza do fuel do Prestige. Avaliación da exposición e danos á saúde en voluntarios e traballadores*. Santiago de Compostela: Área de Medicina Preventiva e Saúde Pública (ISBN:84-688-6048-4). 2004.
- Gill D, Picou J. Technological disaster and chronic community stress. *Soc. Natur. Resour.* 1998; 11: 795-815.
- Grattan LM, Roberts S, Mahan Jr WT, McLaughlin PK, Otwell W.S. The early psychological impacts of the deepwater horizon oil spill on Florida and Alabama communities. *Environ. Health Perspect* .2011; 119: 838-843.
- Ha M, Kwon H, Cheong H, Lim S, Yoo SJ, Kim EJ, Park SG, Lee J, Chung BC. Urinary metabolites before and after cleanup and subjective symptoms in volunteer participants in cleanup of the Hebei Spirit oil spill. *Sci. Total Environ.* 2012; 429: 167-173.
- Hamerlinck FFV. Neopterin: a review. *Exp. Dermatol.* 1999; 8: 167-176.
- Hruškovičová H, Dušková M, Simůnková K, Hill M, Pospíšilová H, Rácz B, Králíková E, Vondra K, Stárka L. Effects of smoking cessation on hormonal levels in men. *Physiol Res.* 2013; 62: 67-73.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J. Exp. Med.* 1984; 160: 310-316.
- Huber C, Fuchs D, Hausen A, Margreiter R, Reibnegger G, Spielberger M, Wachter H. Pteridines as a new marker to detect human T cells activated by allogeneic or modified self major histocompatibility complex (MHC) determinants. *J. Immunol.* 1983; 130: 1047-1050.
- IARC. *Occupational exposures in petroleum refining: crude oil and major petroleum fuels*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 45. International Agency for Research on Cancer. Lyon. 1989.
- Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Orsière T, De Méo M, Gallice P, Bideau C, Iniesta D, Pompili J, Bergé-Lefranc JL, Botta A. A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders. *Mutagenesis*. 2006; 21: 159-165.

- IPCS Environmental Health Criteria 155. *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. World Health Organization. 1993.
- Ishioka N, Umeki S, Hirai Y, Akiyama M, Kodama T, Ohama K, Kyoizumi S. Stimulated rapid expression in vitro for early detection of in vivo T-cell receptor mutations induced by radiation exposure. *Mutat. Res.* 1997; 390: 269-282.
- Ishioka N, Umeki S, Hirai Y, Akiyama M, Kodama T, Ohama K, Kyoizumi S. Stimulated rapid expression in vitro for early detection of in vivo T-cell receptor mutations induced by radiation exposure. *Mutat. Res.* 1997; 390: 269-282.
- ITOPF (The International Tankers Owners Pollution Federation Limited) 2013. Fecha de última consulta: 2 de abril de 2013. <http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/statistics/index.html>.
- Iwamoto KS, Hirai Y, Umeki S, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Kodama T, Ohama K, Nakamura N, Akiyama M. A positive correlation between T-cell-receptor mutant frequencies and dicentric chromosome frequencies in lymphocytes from radiotherapy patients. *J. Radiat. Res.* 1994; 35: 92-103.
- Iwamoto KS, Hirai Y, Umeki S, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Kodama T, Ohama K, Nakamura N, Akiyama M. A positive correlation between T-cell-receptor mutant frequencies and dicentric chromosome frequencies in lymphocytes from radiotherapy patients. *J. Radiat. Res.* 1994; 35: 92-103.
- Janjua NZ, Kasi PM, Nawaz H, Farrooqui SZ, Khuwaja UB, Hassan NU, Jafri SN, Lutfi SA, Kadir MM, Sathiakumar N. Acute health effects of the Tasman Spirit oil spill on residents of Karachi, Pakistan. *BMC Public Health.* 2006; 6: 84.
- Jenny M, Klieber M, Zaknun D, Schroecksnadel S, Kurz K, Ledochowski M, Schennach H, Fuchs D. In vitro testing for anti-inflammatory properties of compounds employing peripheral blood mononuclear cells freshly isolated from healthy donors. *Inflamm. Res.* 2011; 60: 127-135.
- Ji K, Seo J, Liu X, Lee J, Lee S, Lee W, Park J, Khim JS, Hong S, Choi Y, Shim WJ, Takeda S, Giesy JP, Choi K. Genotoxicity and endocrine-disruption potentials of sediment near an oil spill site: Two years after the Hebei Spirit oil spill. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45: 7481-7488.
- Jubri Z, Latif A, Top AG, Ngah WZ. Perturbation of cellular immune functions in cigarette smokers and protection by palm oil vitamin e supplementation. *Nutr. J.* 2013; 12:2.
- Kessler RC. Epidemiology of women and depression. *J. Affect. Disord.* 2003; 74: 5-13.
- Khurshid M, Sheikh M, Iqbal S. Health of people working/living in the vicinity of an oil-polluted beach near Karachi, Pakistan. *EMHJ.* 2008; 14: 179-182.



- Kirschbaum C, Scherer G, Strasburger CJ. Pituitary and adrenal hormone responses to pharmacological, physical, and psychological stimulation in habitual smokers and nonsmokers. *Clin. Investig.* 1994; 72: 804-810.
- Kirsch-Volders M, Bonassi S, Herceg Z, Hirvonen A, Moller L, Phillips D H. Gender-related differences in response to mutagens and carcinogens. *Mutagenesis.* 2010; 25: 213-221
- Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Vande Loock K, Decordier I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 2011; 85: 873-899.
- Klaassen CD, Watkins III JB. Efectos de los tóxicos sobre el sistema inmunitario. En: *Fundamentos de toxicología.* Burn-Naas LA, Meade J, Munson AE. (Eds.) McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 2005; 184-201.
- Knudsen LE y Merlok DF. (Eds.) Biomarkers and human biomonitoring. D.F. RSC publishing. Cambridge (UK). 2012.
- Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 1986; 4: 529-591.
- Kumaravel TS y Jha AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.* 2006; 605: 7-16.
- Kyoizumi S, Umeki S, Akiyama M, Hirai Y, Kusunoki Y, Nakamura N, Endoh K, Konishi J, Sasaki MS, Mori T, Fujita S, Cologne JB. Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people. *Mutat. Res.* 1992; 265: 173-180.
- Kyoizumi S, Umeki S, Akiyama M, Hirai Y, Kusunoki Y, Nakamura N, Endoh K, Konishi J, Sasaki M S, Mori T, Fujita S, Cologne JB. Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people. *Mutat. Res.* 1992; 265: 173-180.
- Lacroix A y Hontela A. A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquat. Toxicol.* 2004; 67: 13-21.
- Laffon B, Fraga-Iriso R, Pérez-Cadahía B, Méndez J. Genotoxicity associated to exposure to *Prestige* oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44: 1714-1723.
- Laffon B, Teixeira JP, Silva S, Loureiro J, Torres J, Pásaro E, Méndez J, Mayan O. Genotoxic effects in a population of nurses handling antineoplastic drugs, and relationship with genetic polymorphisms in DNA repair enzymes. *Am. J. Ind. Med.* 2005; 48: 128-136.

- Laffon B. Fuel oils. *Encyclopedia of Toxicology (3rd edition)*. Wexler P (ed). en imprenta, doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00024-5. Elsevier: Nueva York; 2013.
- Lafuente A, Gonzalez-Carracedo A, Romero A, Cano P, Esquifino AI. Effect of nitric oxide on prolactin secretion and hypothalamic biogenic amine contents. *Life Sci.* 2004; 74: 1681–90.
- Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D. More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin. Chem.* 2002; 48: 579–581.
- Lanza A, Robustelli della Cuna FS, Zibera C, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Somatic mutations at the T-cell antigen receptor in antineoplastic drug-exposed populations: comparison with sister chromatid exchange frequency. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1999; 72: 315-322.
- Lanza A, Robustelli della Cuna FS, Zibera C, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Somatic mutations at the T-cell antigen receptor in antineoplastic drug-exposed populations: comparison with sister chromatid exchange frequency. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1999; 72: 315-322.
- Lee S, Ha M, Kim E, Jeong W, Hur J, Park S G, Kwon H, Hong Y, Ha E, Lee J S, Chung B C, Lee J, Im H, Choi Y, Cho Y, Cheong H. The effects of wearing protective devices among residents and volunteers participating in the cleanup of the Hebei Spirit Oil Spill. *J. Prev. Med. Public Health.* 2009; 42: 89-95.
- Lemiere S, Cossu-Leguille C, Bispo A, Jourdain MJ, Lanhers MC, Burnel D, Vasseur P. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. *Mutat. Res.* 2005; 581: 11–21.
- Léonard A, Bernard A. Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101: 127-133.
- Lukamowicz M, Kirsch-Volders M, Suter W, Elhajouji A. In vitro primary human lymphocyte flow cytometry based micronucleus assay: simultaneous assessment of cell proliferation, apoptosis and MN frequency. *Mutagenesis.* 2011; 26: 763-770.
- Lyons R, Temple J, Evans D, Fone D, Palmer R. Acute health effects of the Sea Empress oil spill. *J. Epidemiol. Commun. H.* 1999; 53: 306-310.
- Maes M, Meltzer HY, Scharpe S, Bosmans E, Suy E, DeMeester I, Calabrese J, Cosyns P. Relationships between lower plasma L-tryptophan level and immune-inflammatory variables in depression. *Psychiatr. Res.* 1993; 49: 151-165.
- Maluf SW y Erdtmann B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis. *Mutat. Res.* 2000; 471: 21-27.

- Massaro E J. Immunotoxicology methods. En: *Handbook of human toxicology*. House, R.V. (Ed.) CRC Press. Boca Raton. 1997; 677-708.
- Maurici D, Aardema M, Corvi R, Kleber M, Krul C, Laurent C, Loprieno N, Pasanen M, Pfuhrer S, Phillips B, Sabbioni E, Sanner T, Vanparys P. Genotoxicity and mutagenicity. *Altern. Lab. Anim.* 2005; 33: 117-130.
- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De M  o MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.* 1993; 288: 47-63.
- Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. *Williams textbook of endocrinology (12th ed.)*. PA: Saunders Elsevier. Philadelphia; 2011.
- Mendelson JH, Sholar MB, Mutschler NH, Jaszyna-Gasior M, Goletiani NV, Siegel AJ, Mello NK. Effects of intravenous cocaine and cigarette smoking on luteinizing hormone, testosterone, and prolactin in men. *J. Pharmacol. Exp.* 2003; 307: 339-348.
- Meo S, Al-Dress A, Meo I, Al-Saadi M, Azeem M. Lung function in subjects exposed to crude oil spill into sea water. *Mar. Pollut. Bull.* 2008; 56: 88-94.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683-765.
- Morita A, Kusaka Y, Deguchi Y, Moriuchi A, Nakanaga Y, Iki M, Miyazaki S, Kawahara K. Acute health problems among the people engaged in the cleanup of the Nakhodka oil spill. *Environ. Res.* 1999; 81: 185-194.
- Moszczyński P, Rutowski J, Słowiński S. The effect of cigarettes smoking on the blood counts of T and NK cells in subjects with occupational exposure to organic solvents. *Cent. Eur. J. Public Health.* 1996; 4: 164-168.
- Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker of the immune system activation. *Curr. Drug Metabolism* 2002; 3: 175-187.
- Na JU, Sim MS, Jo IJ, Song H-G. The duration of acute health problems in people involved with the cleanup operation of the Hebei Spirit oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 2012; 60: 1-2.
- Nakamura N, Umeki S, Hirai Y, Kyoizumi S, Kushiro J-I, Kusunoki Y, Akiyama M. Evaluation of four somatic mutation assays for biological dosimetry of radiation-exposed people including atomic bomb survivors. *Progress in chemical and biological research*. Wiley/Liss. New York. 1991; 341-350.
- Nathan CF. Peroxide and pteridine: A hypothesis of the regulation of macrophage antimicrobial activity by interferon-gamma. Gresser J, ed. *Interferon*. Academic Press. Londres; 1986: 125-143.

- Nishikawa T, Nakamura T, Fukushima A, Tagaki Y. Further evaluation of the skin micronucleus test: Results obtained using 10 polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 2005; 588: 58-63.
- Norppa H, Falck GCM. What do human micronuclei contain?. *Mutagenesis* . 2003; 18: 221-233.
- Nüsse M, Beisker W, Kramer J, Miller BM, Schreiber GA, Viaggi S, Weller EM y Wessels JM. Measurement of micronuclei by flow cytometry. *Methods Cell. Biol.* 1994; 42: 149-158.
- Nüsse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutat. Res.* 1997; 392: 109-115.
- Oh E, Lee E, Im H, Kang H-S, Jung W-W, Won NH, Kim E-M, Sul D. Evaluation of immuno- and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology.* 2005; 210: 65-80.
- Olive PL, Wlodek D y Banáth JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* 1991; 59: 4671-4676.
- Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 1992; 198: 259-267.
- Osofsky HJ, Osofsky JD, Hansel TC. Deepwater Horizon oil spill: Mental Health Effects on residents in heavily affected areas. *Disaster Med. Public Health Preparedness.* 2011; 5: 280-286.
- Palinkas LA, Petterson JS, Russell J, Downs M A. Community patterns of psychiatric-disorders after the Exxon-Valdez oil-spill. *Am. J. Psychiat.* 1993; 150: 1517-1523.
- Palinkas LA, Petterson JS, Russell J, Downs MA. Ethnic differences in symptoms of post-traumatic stress after the Exxon Valdez oil spill. *PDM.* 2004; 19: 102-112.
- Palinkas LA, Russell AJ, Downs MA, Petterson JS. Ethnic-differences in stress, coping, and depressive symptoms after the Exxon Valdez oil-spill. *J. Nerv. Ment. Dis.* 1992; 180: 287-295.
- Pattle SB, Farrell PJ. The role of Epstein Barr virus in cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006; 6: 1193-1205.
- Pérez-Cadahía B, Laffon B, Pásaro E, Méndez J. Genetic damage induced by accidental environmental pollutants. *TheScientificWorldJOURNAL.* 2006; 6: 1221-1237.
- Pérez-Cadahía B, Laffon B, Porta M, Lafuente A, Cabaleiro T, López T, Caride A, Pumarega J, Romero A, Pásaro E, Méndez J. Relationship between blood concentrations of heavy metals and cytogenetic and endocrine parameters among subjects involved in cleaning coastal areas affected by the 'Prestige' tanker oil spill. *Chemosphere.* 2008c; 71: 447-455.

- Pérez-Cadahía B, Laffon B, Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J. Cytogenetic effects induced by *Prestige* oil on human populations: The role of polymorphisms in genes involved in metabolism and DNA repair. *Mutat Res.* 2008b; 653: 117-123.
- Pérez-Cadahía B, Lafuente A, Cabaleiro T, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Initial study on the effects of *Prestige* oil on human health. *Environ. Int.* 2007; 33: 176-185.
- Pérez-Cadahía B, Méndez J, Pásaro E, Lafuente A, Cabaleiro T, Laffon B. Biomonitoring of human exposure to *Prestige* oil: Effects on DNA and endocrine parameters. *Environ. Health Insights.* 2008a; 2: 83-92.
- Prego R, Cobelo-García A. Cadmium, copper and lead contamination of the seawater column on the *Prestige* shipwreck (NE Atlantic Ocean). *Anal. Chem. Acta.* 2004; 524: 23-26.
- Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 1998; 102: 199-209.
- Rodríguez-Trigo G, Zock J-P, Pozo-Rodríguez F, Gómez FP, Monyarch G, Bouso L, Coll MD, Vereá H, Antó JM, Fuster C, Barberá JA, for the SPSG. Health changes in fishermen 2 years after clean-up of the *Prestige* oil spill. *Ann. Intern. Med.* 2010; 153: 489-498.
- Rohleder N, Kirschbaum C. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *Int. J. Psychophysiol.* 2006; 59: 236-243.
- Roman D, Locher F, Suter W, Cordier A, Bobadilla M. Evaluation of a new procedure for the flow cytometric analysis of in vitro, chemically induced micronuclei in V79 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998; 32: 387-396.
- Rosati MV, Sancini A, Tomei F, Andreozzi G, Scimitto L, Schifano MP, Ponticiello BG, Fiaschetti M, Tomei G. Plasma cortisol concentrations and lifestyle in a population of outdoor workers. *Int. J. Environ. Health Res.* 2011; 21: 62-71.
- Sabucedo J, Arce C, Ferraces M, Merino H, Durán M. Psychological impact of the *Prestige* catastrophe. *Int. J. Clin. Health Psychol.* 2009; 9: 105-116.
- Sabucedo JM, Arce C, Senra C, Seoane G, Vázquez I. Symptomatic profile and health-related quality of life of persons affected by the *Prestige* catastrophe. *Disasters.* 2010; 34: 809-820.
- Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, Girotto M. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica.* 1999; 84: 499-504.
- Sarac ES, Girgin G, Palabiyik SS, Charehsaz M, Aydin A, Sahin G, Baydar T. A pilot study on neopterin levels and tryptophan degradation in zinc-exposed galvanization workers. *Biol. Trace Elem. Res.* 2013; 151: 330-334.

- Sawada M, Kubota M, Lin Y-W, Watanabe K-I, Koishi S, Usami I, Akiyama Y, Matsumura T, Furusho K. Prospective study of mutant frequencies at the hprt and T-cell receptor gene loci in pediatric cancer patients during chemotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998; 7: 711-717.
- Schennach H, Murr C, Gächter E, Mayersbach P, Schönitzer D, Fuchs D. Factors influencing serum neopterin concentrations in a population of blood donors. *Clin. Chem.* 2002; 48: 643-645.
- Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta.* 2006; 364: 82-90.
- Schroeksnadel S, Jenny M, Kurz K, Klein A, Ledochowski M, Überall F, Fuchs D. LPS-induced NF-[kappa]B expression in THP-1blue cells correlates with neopterin production and activity of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 399: 642-646.
- Schvoerer C, Gourier-Frery C, Ledrans M, Germonneau P, Derrien J, Prat M, Mansotte F, Guillaumot P, Tual F, Vieuxbled J, Marzin M. Epidemiologic study on short-term health alterations in people participating in the cleanup of places contaminated by Erika oil. [http://www.invs.sante.fr/publications/erika3/rapmaree\\_dist](http://www.invs.sante.fr/publications/erika3/rapmaree_dist). Fecha de última consulta: 2 de abril de 2013. 2000.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175: 184-191.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175: 184-191.
- Sobrinho LG. Prolactin, psychological stress and environment in humans: adaptation and maladaptation. *Pituitary.* 2003; 6: 35-39.
- Spencer ME, Jain A, Matteini A, Beamer BA, Wang N-Y, Leng SX, Punjabi NM, Walston JD, Fedarko NS. Serum levels of the immune activation marker neopterin change with age and gender and are modified by race, BMI, and percentage of body fat. *J. Gerontol. Series A: Biol. Sci. Med. Sci.* 2010; 65: 858-865.
- Steptoe A, Ussher M. Smoking, cortisol and nicotine. *Int. J. Psychophysiol.* 2006; 59: 228-235.
- Suárez B, Lope V, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Rodríguez-Artalejo F, Marqués F, Guzmán A, Vilorio LJ, Carrasco JM, Martín-Montero JM, López-Abente G, Pollán M. Acute health problems among subjects involved in the cleanup operation following the *Prestige* oil spill in Asturias and Cantabria (Spain). *Environ. Res.* 2005; 99: 413-424.
- Surrallés J, Jeppesen P, Morrison H, Natarajan AT. Analysis of loss of inactive X chromosomes in interphase cells. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59: 1091-1096.

- Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 1991; 5: 2516-2522.
- Teles M, Pacheco M y Santos A. Physiological and genetic responses of European eel (*Anguilla anguilla* L.) to short-term chromium or copper exposure- influence of preexposure to PAH-like compound. *Environ. Toxicol.* 2005; 20: 92-99.
- Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. Phillips DH, Venitt S. *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers. Oxford. 1995; 315-339.
- Tomei F, Rosati MV, Baccolo TP, Bernardini A, Ciarrocca M, Caciari T, Tomao E. Response of lympho-monocytes to phytohemagglutinin in urban workers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2004; 17: 13-18.
- Tomei F, Rosati MV, Ciarrocca M, Baccolo TP, Gaballo M, Caciari T, Tomao E. Plasma cortisol levels and workers exposed to urban pollutants. *Industrial Health.* 2003; 41: 320-326.
- Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 1554-1559.
- Tryphonas H, Fournier M, Blakley BR, Smits JEG, Brousseau P. Structural and functional complexity of the immune system and its relationship to immunotoxicology. *Investigative immunotoxicology*. Blakley BR y Kouassi E. (Eds.) Taylor and Francis. Boca Raton. 2005; 3-10.
- Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 1996; 365: 147-159.
- Tulinska J, Jahnova E, Dusinska M, Kuricova M, Liskova A, Ilavska S, Horvathova M, Wsolova L, Kyrtopoulos SA, Collins A, Harrington V, Fuortes L. Immunomodulatory effects of mineral fibres in occupationally exposed workers. *Mutat. Res.* 2004; 553: 111-124.
- Umeki S, Kusunoki Y, Cologne J B, Iwamoto K S, Hirai Y, Seyama T, Ohama K, Kyoizumi S. Lifespan of human memory T-cells in the absence of T-cell receptor expression. *Immunol. Lett.* 1998; 62: 99-104.
- Valdiglesias V, Kiliç G, Amor-Carro O, Mariñas-Pardo L, Ramos-Barbón D, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. In vivo genotoxicity assessment in rats exposed to *Prestige*-like oil by inhalation. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2012; 75: 756-764.
- Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, Amor-carro O, Mariñas-Pardo L, Ramos-Barbón D, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. In vivo genotoxicity assessment in rats exposed to *Prestige*-like oil by inhalation. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2012; 75: 756-764.

- Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Cemeli E, Anderson D, Méndez J. Induction of oxidative DNA damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicol.* 2011; 57: 882-888.
- Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Méndez J. Evaluation of okadaic acid-induced genotoxicity in human cells using the micronucleus test and  $\gamma$ H2AX analysis. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2011; 74: 980-992.
- Valentino R J, Reyes B, Van Bockstaele E, Bangasser D. Molecular and cellular sex differences at the intersection of stress and arousal. *Neuropharmacol.* 2012; 62: 13-20.
- Veraldi A, Costantini AS, Bolejack V, Miligi L, Vineis P, van Loveren H. Immunotoxic effects of chemicals:A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. *Am. J. Ind. Med.* 2006; 49: 1046-1055.
- Vershenya S, Biko J, Drozd V, Lorenz R, Reiners C, Hempel K. Dose-response for T-cell receptor (TCR) mutants in patients repeatedly treated with  $^{131}\text{I}$  for thyroid cancer. *Mutat. Res.* 2004; 548: 27-33.
- Viaggi S, Braselmann H, Nüsse M. Flow cytometric analysis of micronuclei in the CD2+ subpopulation of human lymphocytes enriched by magnetic separation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1995; 67: 193-202.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 503-510.
- Walter RB, Fuchs D, Weiss Gn, Walter TR, Reinhart WH. HMG-CoA reductase inhibitors are associated with decreased serum neopterin levels in stable coronary artery disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41: 1314-1319.
- Weiss G, Murr C, Zoller H, Haun M, Widner B, Ludescher C, Fuchs D. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116: 435-440.
- Wick G, Grubeck-Loebenstien B. Primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly:impact of dietary factors and disease. *Immunol. Rev.* 1997; 160: 171-184.
- Widner B, Laich A, Sperner-Unterweger B, Ledochowski M, Fuchs D. Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link? *Brain Behav. Immun.* 2002; 16: 590-595.
- Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin. Chem.* 1997; 43: 2424-2426.



- 
- Xue Y, Morris M, Ni L, Guthrie SK, Zubieta JK, Gonzalez K, McConnell DS, Domino EF. Venous plasma nicotine correlates of hormonal effects of tobacco smoking. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010; 95: 209-215.
- Zakaria MP, Okuda T, Takada H. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and hopanes in stranded tar-balls on the coasts of Peninsular Malaysia: applications of biomarkers for identifying sources of oil pollution. *Marine Pollut. Bull.* 2001; 42 : 1357-1366.
- Zaknun D, Schroecksadel S, Kurz K, Fuchs D. Potential role of antioxidant food supplements, preservatives and colorants in the pathogenesis of allergy and asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 157:113-124.
- Zock J-P, Rodríguez-Trigo G, Pozo-Rodríguez F, Barberá JA, Bouso L, Torralba Y, Antó JM, Gómez FP, Fuster C, Vereá H, for the S-PSG. Prolonged respiratory symptoms in clean-up workers of the *Prestige* oil spill. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 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 JM, Barberá JA. Persistent respiratory symptoms in clean-up workers 5 years after the *Prestige* oil spill. *Occup. Environ. Med.* 2012; 69: 508-513.



*Anexo*

---



**ANEXO**

Código individuo:
Data:
Lugar de mostraxe:



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

Nome:.....

DNI:.....

Teléfono móbil:.....

E-mail:.....

Idade:.....anos

Sexo: Muller  Home

Consumo de tabaco: Non fumador

Fumador

Ex-fumador

Nº cigarrillos/día:.....

Anos que hai que deixou de fumar:.....

Nº anos fumando:.....

Consumo de café/té:

Nº tazas/día:.....

Consumo de alcohol:

Nº medidas/semana:.....

Enfermidades recentes e/ou crónicas:

Cales e hai canto tempo:.....

.....

.....

Vacunacións recentes:.....

Consumo de medicamentos:.....

.....

.....

Probas diagnósticas:

*Radiografías recentes (cantas, hai canto tempo):*.....

*TACs recentes (cantos, hai canto tempo):*.....

*Resonancias recentes (cantas, hai canto tempo):*.....

Historia ocupacional:

*Posto de traballo actual e data de inicio:*.....

*Traballos anteriores e datas:*.....

.....

.....

Participación na recollida de fuel:

*Lugar onde estivo e data:*.....

.....

*Nº días (indicar se son continuos ou non):*.....

*Nº horas/día:*.....

*Protección:*    *Luvras*         *Traxe*         *Mascariña*

Sintomatoloxía:

¿Tivo algunha alteración da saúde despois de participar na limpeza que poida estar relacionada coa exposición ao fuel?:

*Síntomas respiratorios (problemas para respirar, sofoco, asma, etc.):*.....

.....

.....

*Síntomas dermatolóxicos (picor, eritema, irritación na pel, irritación nas mucosas ou ollos, etc.):*.....

.....

.....

*Síntomas neurolóxicos ou psicolóxicos (dores de cabeza, mareos, insomnio, depresión, ansiedade):*.....

.....

.....

¿Estivo a tratamento por algunha desas alteracións?:.....

.....

.....

