



Universitat Autònoma de Barcelona

Efecte genotòxic del fuel del petrolier Prestige: Estudi de seguiment sis anys després de l'exposició

Memòria presentada per

Alexandra Francès Reig

Per optar al títol de

Doctora en Biologia Cel·lular

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de les **Dres. Carme Fuster Marquès i Cristina Templado Meseguer**

Carme Fuster Marquès

Cristina Templado Meseguer

Alexandra Francès Reig

Bellaterra, 30 de maig de 2013

Aquest treball s'ha realitzat amb la finançament de:

Sociedad Española de Neurología y Cirugía Torácica (SEPAR)

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

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

CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

Servicio de Salud Gallego (SERGAS)

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

Fondo de investigación Sanitaria, FIS (PI03/1685 i PI07/0086)

Contracte predoctoral, CIBERES 2009

Resum

El petrolier Prestige (2002) es va enfonsar abocant al mar unes 65.000 tones de fuel que, dies després, van contaminar les costes gallegues. Durant les tasques de neteja, més de 300.000 persones van estar exposades als components genotòxics del fuel, com el benzè i el benzopirè. El nostre grup va realitzar un estudi genotòxic dos anys després de l'exposició al fuel (Prestige I), observant un augment de les alteracions cromosòmiques estructurals en els individus exposats. L'associació existent entre l'augment de les alteracions cromosòmiques i el risc de desenvolupar càncer va fer que es plantegés la necessitat de realitzar un estudi de seguiment (Prestige II).

Aquesta tesi doctoral té com objectiu principal determinar si l'efecte genotòxic, prèviament detectat, persisteix sis anys després de l'exposició. S'han estudiat 104 pescadors gallegues, 58 exposats i 46 no exposats al fuel, amb cultius estàndards de limfòcits de 48 h. A més, s'han realitzat cultius de limfòcits amb afidicolina en 44 d'aquests mateixos individus, per comprovar l'existència d'errors en la reparació de l'ADN. Basant-nos en els resultats d'aquest treball, en els obtinguts prèviament (Prestige I i Prestige II cultius de 72 h) i en les comparacions realitzades entre ells, podem concloure que: a) en els estudis de seguiment només s'han inclòure els individus prèviament analitzats, b) les lesions cromosòmiques no són un bon biomarcador de genotoxicitat quan el temps transcorregut des de l'exposició al fuel és superior a dos anys, c) el temps de cultiu no afecta a la detecció de dany cromosòmic després de dos anys de l'exposició, d) la freqüència d'alteracions cromosòmiques estructurals en individus exposats al fuel és entre dos i tres vegades superior a la descrita en la població normal, confirmant que l'efecte genotòxic persisteix sis anys després de l'exposició, e) l'augment d'alteracions cromosòmiques en els individus no exposats suggereix que han estat sotmesos a una exposició secundària al fuel (aliments contaminats o residus emmagatzemats) o a algun altre agent genotòxic, que els ha fet empitjorar des del Prestige I, f) l'augment del dany detectat en individus exposats al fuel, tan en Prestige I com en Prestige II, està associat a errors en la reparació de l'ADN. Finalment, l'interès socio-sanitari dels nostres resultats, posa de manifest la necessitat de portar a terme estudis semblants que permetin confirmar si l'exposició accidental al fuel incrementa el risc de desenvolupar càncer.

Abstract

The tanker Prestige (2002) wrecked and spill about 65.000 tons of oil and pollutants into the sea at the Galician coasts. During the cleaning tasks, more than 300.000 people were exposed to genotoxic oil components, like benzene and benzopyrenne. Our group carried out a genotoxic study two years after the exposure to oil (Prestige I) and showed an increase in structural chromosome alterations in exposed individuals. The associations between the increase of chromosomal alterations and the risk of developing cancer revealed the importance of conducting a follow-up study (Prestige II).

The main objective of this doctoral thesis is to determine if the previously detected genotoxic effect persists six years after the exposure. We have analyzed 104 fishermen, 58 exposed and 46 not exposed to the oil, with conventional culturing of 48 h lymphocytes. And 44 of the same individuals were studied with culturing with aphidicolin, to test possible errors in DNA repair. Based on our results, the results of the previous studies (Prestige I 72 h and Prestige II 72h) and the comparison between them, we must conclude that: a) follow-up studies only have to include previously studied individuals, b) chromosomal lesions are not a good genotoxicity biomarker when the fuel is not present, c) the time of culturing does not affect the detection of chromosomal damage two years after the exposure, d) the frequency of structural chromosome alterations is about two times higher than described in normal population, which confirms that genotoxic effect previously detected still persists six years after the exposure, e) the increase of damage in non-exposed individuals makes us believe that these individuals have undergone a less intense exposure to the oil (contaminated food or stored residues) or to another genotoxic agent, which affected them, f) the high damage in exposed individuals, in Prestige I and Prestige II, is associated with errors in DNA repair. Finally, the socio-sanitary interest of our results shows the need for similar studies to confirm if accidental exposure to oil increases the risk of developing cancer.

Abreviatures

apc	Afidicolina
BER	Reparació per escissió de base
chsb	Trencament de cromosoma
chsg	Gap de cromosoma
chtb	Trencament de cromàtide
chtg	Gap de cromàtide
CNV	Variació en el nombre de còpies
Cyt-B	Citocalasina B
DMSO	Dimetil sulfòxic
DSBR	Reparació de trencaments de doble cadena
E	Exposats
FCS	Sèrum boví fetal
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FSM	Mètode multinomial per als llocs fràgils
HAPs	Hidrocarburs aromàtics policíclics
HPW	Treballadors amb màquines de vapor a pressió
HR	Recombinació homòloga
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPCS	International Program on Chemical Safety
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclatura
MMR	Reparació d'aparellaments incorrectes
MN	Micronuclis
MW	Treballadors manuals
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NE	No exposats
NER	Reparació per escissió de nucleòtid
NHEJ	Reunió no homòloga d'extrems
NIEHS	National Institute of Environmental Health Sciences
SCE	Intercanvi de cromàtides germanes
SEPAR	Sociedad Española de Neumología i Cirugía Torácica
V	Voluntaris

ÍNDEX

Introducció	11
1. Agents genotòxics	13
1.1. Exposició crònica i aguda a mutàgens químics	13
1.2. Mutàgens químics	14
2. Biomarcadors genotòxics	17
2.1. Lesions i alteracions cromosòmiques	21
3. Mecanismes de reparació del dany genotòxic	26
4. Alteració de la reparació de l'ADN: cultius amb afidicolina	28
5. Exposició al fuel abocat pel petrolier Prestige	30
5.1. Característiques del fuel vessat	32
5.2. Efectes de l'exposició als vessaments de fuel	33
5.2.1. Efectes genotòxics de l'exposició aguda al fuel	35
5.3. Projecte SEPAR-Prestige	38
5.3.1. Estudi inicial: Prestige I	38
5.3.2. Estudi de seguiment: Prestige II	41
Objectius	43
Materials i mètodes	47
1. Participants en l'estudi de genotoxicitat	49
2. Tipus de mostra, recol·lecció i transport	51
3. Processament de les mostres: cultius de limfòcits	52
3.1. Cultius de limfòcits de 48 hores	55
3.2. Cultius de limfòcits amb addició d'afidicolina	57
4. Tinció seqüencial uniforme – bandes G	58
5. Anàlisi citogenètica	59
6. Anàlisi estadística	61
6.1. Anàlisi dels punts de trencament	61
Resultats	65
1. Característiques generals de la població estudiada	67
2. Anàlisi citogenètica de la població estudiada	68
2.1. Lesions cromosòmiques	69
2.2. Alteracions cromosòmiques estructurals	71
2.3. Alteracions cromosòmiques numèriques	74
2.4. Cromosomes, braços i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel	76
2.4.1. Bandes cromosòmiques	79
3. Comparació de les dades citogenètiques del Prestige I i Prestige II	81
3.1. Lesions cromosòmiques	81
3.2. Alteracions cromosòmiques estructurals	83
3.3. Cromosomes, braços i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel	85
4. Errors en la reparació de l'ADN: Cultius amb afidicolina	86

4.1. Cromosomes, braços i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel	87
Discussió	89
1. Característiques del present estudi genotòxic	91
1.1. Criteris estrictes en la selecció d'individus	92
1.2. Lesions i alteracions cromosòmiques estructurals com biomarcadors de genotoxicitat	93
1.3. Tipus de cultius de limfòcits de sang perifèrica	94
1.4. Temps transcorregut per realitzar l'estudi de seguiment	95
1.5. Estudi de seguiment	96
1.6. Limitacions de l'estudi	96
2. Efecte genotòxic 6 anys després de l'exposició aguda al fuel: Estudi de seguiment	97
2.1. Dany genotòxic detectat dos i sis anys després de l'exposició al fuel: Estudis SEPAR-Prestige	98
2.2. Increment del dany en individus no exposats al fuel	101
3. Bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició aguda al fuel	103
4. Efectes del fuel sobre la reparació de l'ADN	107
5. Implicacions en la salut de l'exposició al fuel	108
Conclusions	111
Bibliografia	131
Annexes	133
Agraïments	

Introducció

1. Agents genotòxics

Un agent genotòxic és qualsevol agent físic, químic o biològic capaç de produir danys en el material genètic, de manera directa o indirecta. Aquests agents provoquen alteracions que poden ser temporals, permanents o, fins i tot, letals, originant, entre d'altres, mutacions gèniques o cromosòmiques, errors en la reparació/replicació de l'ADN o en la segregació cromosòmica. L'activitat genotòxica no té un llindar d'acció conegut per sota del qual es pugui assegurar que no existeix cap risc (Surrallés *et al.*, 1997).

El principal mutagen físic són les radiacions, el seu efecte biològic es deriva de l'energia que li cedeixen als teixits vius en travessar-los. Les més estudiades han estat les radiacions ionitzants d'alta energia que són capaces de fer saltar els electrons de la matèria orgànica, ionitzant-la. El seu mode d'acció pot ser directe, si actua sobre l'ADN, o indirecte si actua sobre les molècules d'aigua provocant la seva hidròlisi i la formació de radicals lliures que poden afectar finalment el material genètic (Mateuca *et al.*, 2006; revisat per Dauer *et al.*, 2010; Selzer *et al.*, 2011).

Dins els mutàgens biològics destaquen els agents infecciosos com virus, bacteries i protozous. Un dels més estudiats són els virus d'ARN o retrovirus que repliquen el seu material genètic, el transformen en ADN i l'integren en el genoma de la cèl·lula hoste. La integració del genoma víric pot provocar trencaments cromosòmics, alteracions cromosòmiques i mutacions gèniques (Uren *et al.*, 2005; Braoudaki *et al.*, 2011).

En el genoma humà trobem elements genètics mòbils, transponibles, que poden actuar com a agents genotòxics i que es caracteritzen per la seva capacitat de canviar de posició i de nombre de còpies, ja que poden replicar-se de manera independent. Els seus principals efectes genotòxics són: mutacions gèniques, lesions i alteracions cromosòmiques estructurals, especialment delecions i insercions (Kazazian, 2004; Abrusan *et al.*, 2006; Ivics *et al.*, 2010).

1.1. Exposició crònica i aguda a mutàgens

Durant el transcurs de la vida, estem contínuament exposats a l'acció d'agents genotòxics del medi que ens envolta, de forma ambiental, crònica/ocupacional o aguda en el cas dels accidents.

L'exposició ambiental es produeix quan l'agent genotòxic es troba, de manera més o menys natural al medi ambient. Normalment, implica l'exposició a una àmplia barreja d'agents químics amb desenes de milers de substàncies (no a compostos individuals), pocs dels quals han estat identificats i quantificats (revisat per Angerer *et al.*, 2007). L'origen de l'exposició ambiental pot ser fruit de diferents fenòmens: processament dels aliments, residus produïts per la crema de combustibles fòssils, restes de productes i emissions de la indústria, fuites de magatzems i dipòsits, fum del tabac, etc.

L'exposició de forma continua a aquests mutàgens es coneix com exposició crònica i pot originar una gran varietat de respostes en funció de l'estil de vida individual, la predisposició genètica i els hàbits de treball (revisat per Angerer *et al.*, 2007). No obstant, són moltes les publicacions que descriuen que les persones sotmeses a una exposició crònica a un mutagen químic tenen un major risc de patir càncer (Schnatter *et al.*, 1996; Carere *et al.*, 2002; Pitarque *et al.*, 2002; Testa *et al.*, 2005., Garte *et al.*, 2005; Tovalín *et al.*, 2006; Cárdenas- Bustamante *et al.*, 2007; Barregard *et al.*, 2009).

L'exposició aguda a un agent genotòxic es produeix de forma accidental. Determinades situacions poden provocar que amplis grups de persones es vegin exposades de manera puntual a altes dosis d'algun agent genotòxic, com ocorre en el cas dels vessaments de petrolers, els accidents a centrals nuclears, les fuites massives de la indústria, etc. Els efectes poden ser molt variables en funció del tipus d'agent, la intensitat/temps d'exposició i els sistemes de protecció emprats (revisat per Aguilera *et al.* 2010, revisat per Barret *et al.*, 2012).

1.2. Mutàgens químics

Són compostos químics capaços d'actuar de manera directa o indirecta sobre l'ADN i induir mutacions gèniques o cromosòmiques. Els agents que actuen indirectament, per poder interactuar amb el material genètic, han de ser metabolitzats pels sistemes enzimàtics cel·lulars. Els seus efectes són molt variats: a) interfereixen en la síntesi de l'ADN, mitjançant la inhibició dels enzims implicats en la replicació, b) modifiquen les propietats químiques de l'ADN, formant enllaços covalents entre les cadenes d'ADN, c) indueixen trencaments de cromàtide o de cromosoma (revisat per Greim i Reuter, 2001; revisat per Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2009). En general, les bandes G clares presenten una major tendència a veure's afectades per l'acció de mutàgens químics que les bandes G fosques.

Les bandes G clares són regions transcripcionalment actives que durant la interfase adopten una conformació més oberta, més accessible, més vulnerable que les d'heterocromatina. La distribució dels punts de trencaments en el genoma reflecteix la interacció complexa entre l'estructura i l'ordenament dels cromosomes en el moment de l'exposició a l'agent genotòxic i els diferents mecanismes de reparació de l'ADN (Obe *et al.*, 2002).

Determinats agents químics constituents del fuel, han estat classificats per la IARC (2012) (*International Agency for Research on Cancer*) com: possibles carcinògens (naftalè, benzofluorantè i benzoantracè), probables carcinògens (dibenzoantracè) i carcinògens (benzè i benzopirè). No obstant, la seva toxicitat en humans és difícil d'establir, degut a que l'exposició a aquests productes es produeix sempre en barreges complexes amb altres compostos, en treballadors de refineries, indústries de carbó, alumini, carbonat càlcic, pavimentació, etc (IARC, 2002, 2010, 2012).

Benzè

El benzè és un hidrocarbur aromàtic que es pot trobar, en quantitats residuals, a l'aire, com a conseqüència de processos antropogènics com les emissions de la indústria, l'evaporació del fuel a les benzineres i el fum dels cotxes i el tabac. També es pot trobar a l'aigua i a aliments contaminats (IARC, 2012). El benzè és un agent generador de radicals lliures que per aconseguir l'activitat genotòxica ha de patir canvis metabòlics complexes (Fig. 1). Aquests canvis metabòlics donen lloc a la formació de benzoquinones, muconaldehids i espècies reactives d'oxigen (ROS) que són responsables del dany oxidatiu a l'ADN. Aquest procés, on participen diferents sistemes enzimàtics, té lloc al fetge, al pulmó i a la medul·la òssia (Smith *et al.*, 1998 i revisat per McHale *et al.*, 2012). Les benzoquinones i els muconaldehids també poden generar trencaments de doble cadena per la inhibició de la topoisomerasa II (Chen i Eastmond, 1995; Frantz *et al.*, 1996).

L'efecte genotòxic del benzè ha estat molt estudiat, especialment en treballadors sotmesos a dosis baixes, durant llargs períodes de temps (Tunka *et al.*, 1996; Forni, 1996; Zhang *et al.*, 1996, 1998a; Smith *et al.*, 1998a; O'connor *et al.*, 1999; Tompa *et al.*, 2004; Roma-Torres *et al.*, 2006; Keretsetse *et al.*, 2008; Paz-y-Miño *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2008). En aquests estudis s'ha descrit un augment de les hiperploïdies del cromosoma 9 (Zhang *et al.*, 1996), de les monosomies dels cromosomes 8 i 21 (Smith *et al.*, 1998a) i de la deleció

dels braços llargs dels cromosomes 5 i 7 (Zhang *et al.*, 1998a). En aquests treballs però, només analitzen un número reduït de cromosomes, mitjançant FISH dels cromosomes 1, 5, 7, 8, 9 i 21. Per tant, aquests estudis no poden afirmar que els cromosomes que han trobat afectats siguin ni els únics, ni els més afectats, per l'exposició crònica al benzè.

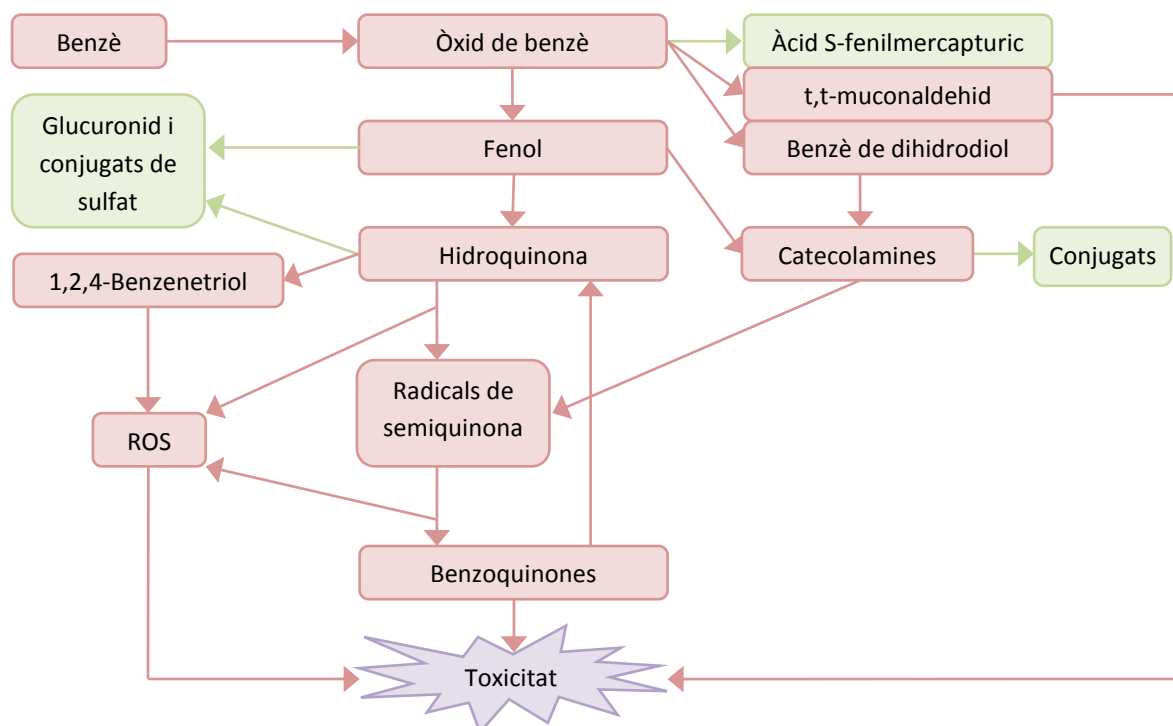


Figura 1. Esquema de les principals vies metabòliques del benzè que condueixen a la formació d'espècies reactives d'oxigen que poden tenir efectes genotòxics (modificada de McHale *et al.*, 2012).

En treballadors de refineries de petroli, exposats crònicament al benzè, els estudis genotòxics han constatat l'alteració dels mecanismes de reparació de l'ADN mitjançant el tractament dels cultius amb radiació ultraviolada, determinant l'expressió del gen HPRT i mesurant l'estat de l'estrès oxidatiu (Tompa *et al.*, 2005; Keretsetse *et al.*, 2008). També s'ha descrit un increment del dany cromosòmic (gaps i trencaments) mitjançant l'assaig cometa (Roma-Torres *et al.*, 2006; Paz-y-Miño *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2008) i un augment de les alteracions cromosòmiques, especialment dels fragments acèntrics (Forni, 1996; Tunka *et al.*, 1996). Aquests treballs presenten algunes limitacions: Roma-Torres *et al.* (2006) i Pandey *et al.* (2008) analitzen lesions però no alteracions cromosòmiques estructurals; Paz-y-Miño *et al.* (2008) analitzen només alguns tipus d'alteracions

estructurals (fragments acèntrics i cromosomes dicèntrics). Per últim, Forni *et al.* (1996) i Tunka *et al.* (1996) analitzen tan lesions com alteracions cromosòmiques però no especifiquen els tipus d'alteracions observades. Cap dels estudis recull els punts de trencament.

No hi ha estudis semblants en individus exposats de forma aguda a al benzè.

A més, és interessant fer referència a que en els individus exposats crònicament al benzè s'ha trobat una major incidència de diferents tipus de càncer: leucèmia mielòid aguda, síndrome mielodisplàsica, limfoma No-Hodgkin, leucèmia limfocítica, leucèmia no limfocítica aguda, càncer de pulmó, càncer nasofaríngi, anèmia aplàsica i hematotoxicitat (Infante *et al.*, 1983; Schnatter *et al.*, 1996; Hayet *et al.*, 1997; 2001 i Smith *et al.*, 1998b).

El benzè ha estat classificat per la IARC (1982) com a agent carcinogen en humans, basant-se en els estudis realitzats en persones exposades ocupacionalment al benzè.

Benzopirè

El benzopirè és un hidrocarbur aromàtic d'alt pes molecular que es pot trobar en l'aire, l'aigua i el terra en quantitats residuals, excepte prop de les seves fonts on la concentració augmenta. També està present en alguns aliments, productes farmacèutics i en el fum del tabac (IARC, 2012).

S'origina durant la combustió incompleta de material orgànic. Al igual que el benzè, el benzopirè, ha de ser processat per sistemes metabòlics complexos que el transformen en espècies reactives que són les responsables dels danys en l'ADN, mitjançant un procés d'oxidoreducció (Xue i Warshawsky, 2005). L'exposició ocupacional a aquest agent químic té lloc per inhalació i per contacte directe a la pell en les indústries que treballen amb petroli, alumini, carbó i a plantes d'energia, on els nivells de benzopirè oscil·len entre baixos, mitjos i alts depenent del tipus d'indústria (IARC, 2012).

L'exposició al benzopirè està directament relacionada amb l'aparició de tumors en totes les espècies animals testades, amb un efecte carcinogènic tan local com sistèmic. Pot generar tumors de pell, gola, estómac, fetge, limfomes i càncers hematopoiètics entre d'altres (Shimizu *et al.*, 2000; Wijnhoven *et al.*, 2000; Estensen *et al.*, 2004; Balansky *et al.*, 2007).

El benzopirè ha estat classificat per la IARC (2012) com a agent carcinogen en humans, basant-se en els experiments realitzats en animals.

2. Biomarcadors genotòxics

Els biomarcadors són paràmetres que permeten avaluar l'exposició d'un organisme a un agent genotòxic. Es poden classificar en biomarcadors d'exposició i biomarcadors d'efecte (Taula 1). Els primers indiquen si un individu determinat ha estat en presència d'un agent genotòxic; mentre que els biomarcadors d'efecte detecten si l'exposició està a una major probabilitat de presentar efectes adversos com ara càncer (IPCS, 1993; revisat per Bonassi *et al.*, 2005). Des de 1930, amb la determinació de biomarcadors en fluids corporals, la medicina ocupacional ha intentat protegir els individus de l'exposició a productes potencialment tòxics. Aquest mètode d'estudi es coneix com biomonitorització humana (revisat per Albertini *et al.* 2000 i per Bonassi *et al.*, 2005; Au *et al.*, 2007). Els biomarcadors poden veure's afectats per polimorfismes genètics de la població, que condicionen la resposta individual front a l'exposició a agents genotòxics (Norppa, 2004).

Taula 1. Classificació dels biomarcadors genotòxics

	Biomarcadors	
	d'exposició	d'efecte
Adductes de proteïnes	Si	No
Adductes d'ADN	Si	Si
Intercanvis de cromàtides germanes	Si	No
Assaig cometa	Si	No
Assaig de micronuclis	Si	No
Alteracions cromosòmiques	Si	Si

En general, en les situacions d'exposicions agudes, és necessari obtenir les mostres a analitzar ràpidament. No obstant, el temps òptim de recollida de les mostres dependrà del biomarcador de genotoxicitat que s'hagi triat per realitzar l'estudi (revisat per Albertini *et al.*, 2000).

Adductes de proteïnes

Són substàncies químiques unides covalentment a les proteïnes que es formen per l'acció d'agents electrofílics (o dels seus metabòlits) quan reaccionen amb aminoàcids de l'hemoglobina, especialment amb cistines, histidines i valines (Törnqvist i Ehrenberg, 1994). El nivell d'adductes detectat s'associa a l'efecte produït per l'agent genotòxic. Els adductes de proteïnes han estat utilitzats com a biomarcadors de l'exposició a mutàgens i també per identificar i quantificar el tipus d'exposició (Farner P, 1995). Donat que la vida útil dels eritròcits és aproximadament d'uns 120 dies, la mesura dels adductes en l'hemoglobina proporciona informació sobre exposicions que han tingut lloc, com a màxim, 4 mesos abans de l'obtenció de la mostra (Tannenbaum *et al.*, 1993).

Adductes d'ADN

S'uneixen covalentment a l'ADN, s'utilitzen, principalment, com biomarcadors d'exposició però també com biomarcadors d'efecte, ja que poden predir el risc de patir càncer. El nivell d'adductes d'ADN a un teixit determinat es correlaciona amb l'exposició. La seva quantitat en un teixit o òrgan determinat no s'associa necessàriament amb el desenvolupament de càncer en el mateix teixit. El moment òptim d'obtenció de la mostra és entre unes hores i uns pocs dies després de l'exposició (Hemminki *et al.*, 1994; Qian *et al.*, 1994; Culp *et al.*, 1996; revisat per Albertini *et al.*, 2000).

Intercanvis de cromàtides germanes (SCE)

L'intercanvi recíproc entre dues cromàtides germanes (SCE) d'un cromosoma augmenta la seva freqüència amb l'exposició a agents genotòxics (Painter, 1980; revisat per Albertini *et al.*, 2000). La seva detecció requereix que la replicació de l'ADN es produeixi en presència de bromodeoxiuridina (BrdU) en dos cicles cel·lulars consecutius. Les mostres han de ser obtingudes, com a màxim, unes poques hores després de la finalització de l'exposició (Tucker *et al.*, 1993; revisat per Albertini *et al.*, 2000).

Aquest biomarcador s'utilitza habitualment com a biomarcador de l'exposició en limfòcits de sang perifèrica i no com a biomarcador d'efecte ja que no s'ha pogut constatar una associació clara entre una elevada freqüència d'SCEs i un augment del risc de patir càncer (Yager *et al.*, 1993; Hagmar *et al.*, 1994, 1998).

Assaig cometa

Les cèl·lules amb majors nivells de danys a l'ADN presenten una migració alterada al realitzar l'electroforesi. Sota condicions neutres, la migració de l'ADN augmenta pels trencaments de doble cadena, mentre que sota condicions alcalines, la migració augmenta pels trencaments de cadena, tan simples com dobles. Aquest assaig és una tècnica sensible que no requereix cultius cel·lulars (revisat per Collints *et al.*, 1997; Miyamae *et al.*, 1997; revisat per Speit i Hartmann *et al.*, 1999). L'únic inconvenient important és el dany no específic de l'ADN produït durant el processament de les cèl·lules. L'assaig cometa és un biomarcador d'exposició a agents genotòxics, però no d'efecte. El temps d'obtenció de les mostres ha de ser com a màxim unes poques hores després de l'exposició (revisat per Albertini *et al.*, 2000).

Assaig de micronuclis

Els micronuclis (MN) són petites porcions de cromatina extranuclears que es formen durant la mitosi a partir de fragments acèntrics o de cromosomes sencers. Els MN no són inclosos junt al nucli principal degut a defectes en el centròmer o a problemes en la unió amb el fus mitòtic (Fenech i Morley, 1985; Fenech, 1993; revisat per Albertini *et al.*, 2000).

L'assaig de MN es realitza en cultius de limfòcits de sang perifèrica tractats amb citocalasina-B (un inhibidor de la citocinesi), per tal d'aturar la divisió cel·lular quan la majoria de cèl·lules es trobin en l'estat binucleat. La freqüència de MN en cèl·lules de cultiu binucleades inclou MN preexistents, procedents de divisions *in vivo*, que s'originen durant el procés de maduració dels limfòcits en la medul·la òssia, la melsa, el timus i els nodes limfàtics (Fenech *et al.*, 1997; Martino-Roth *et al.*, 2003). L'assaig de MN s'utilitza com biomarcador d'exposició a agents genotòxics però no com biomarcador d'efecte. El moment òptim de recol·lecció de les mostres és durant l'exposició o poc després (revisat per Albertini *et al.*, 2000).

Lesions i alteracions cromosòmiques

El 90% del dany en l'ADN induït per diferents agents genotòxics és reparat correctament, mentre que el 10% restant o no és reparat o és reparat de manera incorrecta, originant lesions i alteracions cromosòmiques (Natarajan i Obe, 1978; Obe *et al.* 2002; revisat per Studer *et al.*, 2013). Aquests biomarcadors s'han utilitzat tradicionalment per l'estudi genotòxic de l'exposició a la radiació ionitzant i a un ampli rang d'agents químics (revisat per Zhang *et al.*, 2002 i per Holeckova *et al.*, 2004).

Les alteracions cromosòmiques estructurals són utilitzades com a biomarcadors d'exposició i com a biomarcadors d'efecte, ja que un augment en la seva freqüència està directament associat a un augment del risc a patir càncer (Carrano i Natarajan, 1988; Mitelman, 1994; Anderson i Zeiger, 1997; Tawn, 1997).

2.1. Lesions i alteracions cromosòmiques

Lesions cromosòmiques

Les lesions cromosòmiques s'observen com discontinuïtats del material cromosòmic al microscopi òptic, en metafases tenyides uniformement (Kasuba *et al.*, 2000). Es classifiquen com a gaps quan no hi ha desplaçament de les cromàtides o com a trencaments quan les cromàtides s'han desplaçat (Fig. 2). En ambdós casos poden afectar a una cromàtida o al cromosoma sencer.

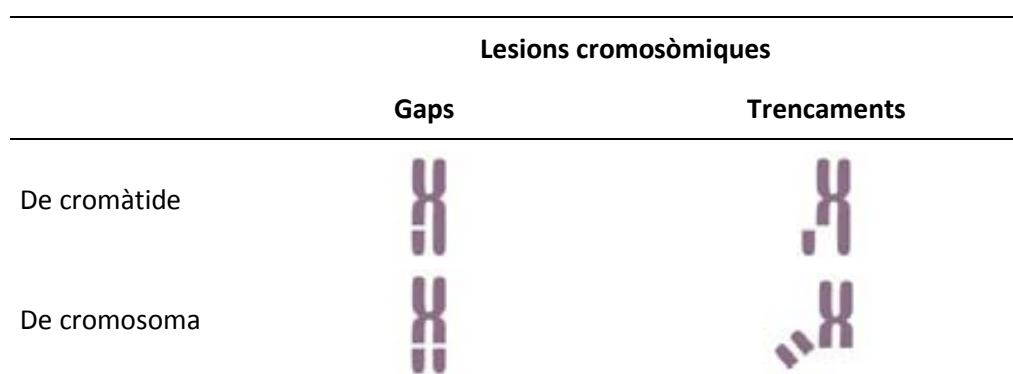


Figura 2. Tipus de lesions cromosòmiques.

Alteracions cromosòmiques estructurals

Les alteracions cromosòmiques, encara que algunes es poden detectar amb tinció uniforme, la majoria requereixen l'aplicació de tècniques d'identificació, com el bandeig cromosòmic o la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) (Edwards, 2000).

A la Figura 3 es mostren els diferents tipus d'alteracions cromosòmiques estructurals. Poden ser classificades en estables o inestables, en funció de si la seva estructura permet que es conservin al llarg de les diferents divisions cel·lulars. Les alteracions cromosòmiques estructurals inestables poden perdre's al llarg de les divisions cel·lulars, mentre que les estables, com les translocacions, es mantenen durant els successius cicles cel·lulars i acumulant-se al llarg del temps (Tawn i Whitehouse, 2001). Els estudis de genotoxicitat normalment es centren en l'anàlisi de les inestables, com cromosomes dicèntrics, anells, etc, que presenten una freqüència en la població molt baixa (Edwards, 1997).

En funció de si hi ha pèrdua o guany de material genètic o no, les alteracions estructurals poden ser classificades en equilibrades o desequilibrades. Per últim es poden classificar en intercromosòmiques, quan impliquen dos cromosomes diferents no homòlegs o intracromosòmiques quan afecten un únic cromosoma (Savage, 1975; revisat per Shaffer i Lupski, 2000).

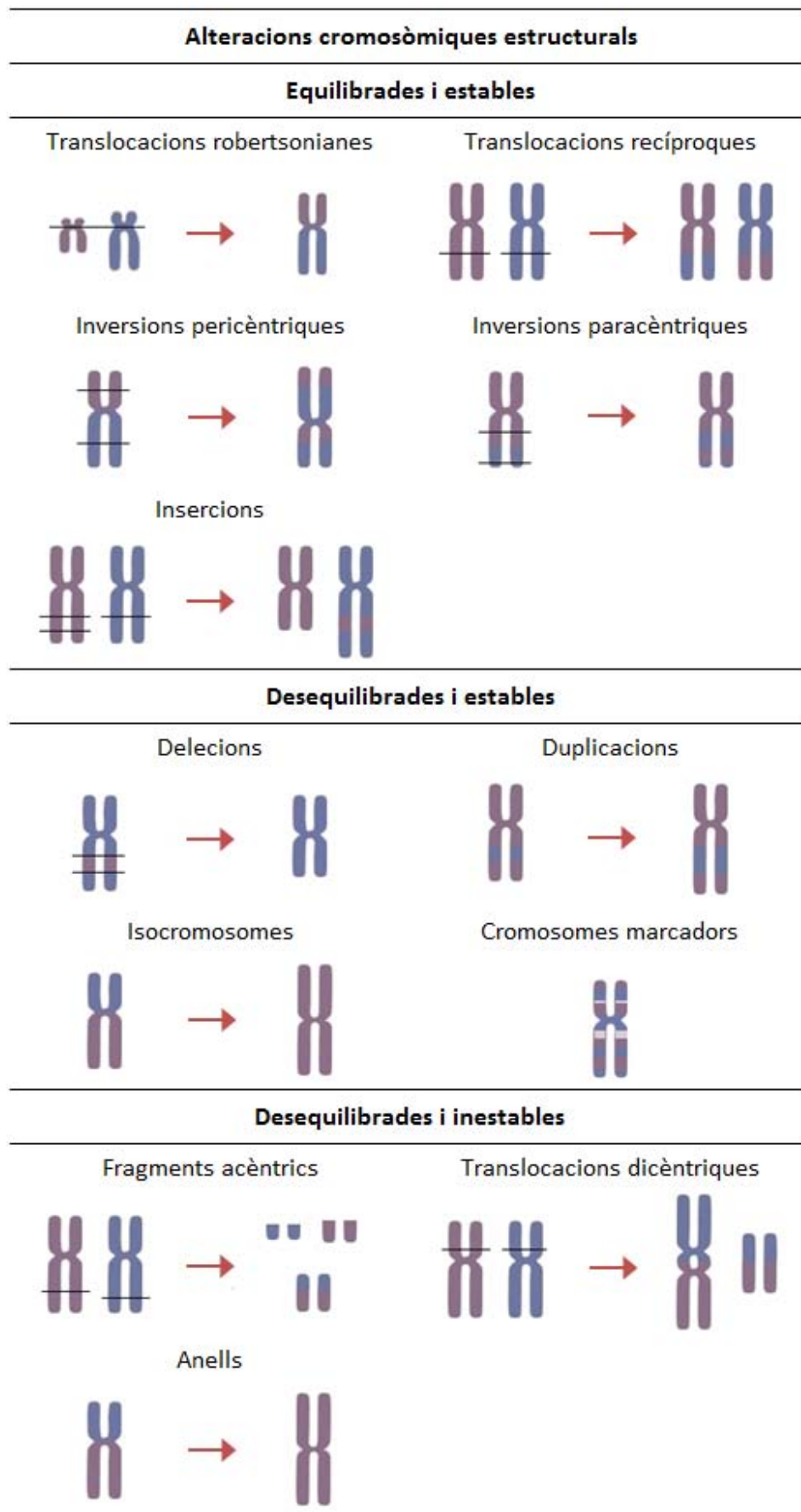


Figura 3. Tipus d'alteracions cromosòmiques estructurals.

Alteracions estructurals equilibrades i estables

Les *translocacions Robertsonianes* són intercanvis de braços sencers entre dos cromosomes acrocèntrics. Els trencaments es produeixen en els braços curts, propers als centròmers, donant lloc a un cromosoma dicèntric que normalment no presenta problemes d'inestabilitat, gràcies a la inactivació d'un dels centròmers per mecanismes encara desconeguts. Aquesta alteració implica la pèrdua dels braços curts romanents sense afectar el fenotip (Kim i Shaffer, 2002).

Les *translocacions recíproques* impliquen l'intercanvi recíproc de fragments terminals de dos cromosomes, sense que es produeixi una pèrdua de material genètic.

Les *inversions pericèntriques* són reordenaments intracromosòmics que s'originen per dos trencaments, un a cada braç cromosòmic, i la posterior inversió i reunió del segment alliberat que conté el centròmer (Kaiser, 1988).

Les *inversions paracèntriques* s'originen quan tenen lloc dos trencaments en un mateix braç cromosòmic seguits de la inversió i reunió del segment cromosòmic. En aquest cas la posició del centròmer no es veu afectada (Madan, 1988).

Les *insercions* són reordenaments intercromosòmics en els quals un fragment d'un cromosoma s'intercala en un cromosoma no homòleg. La seva formació necessita, com a mínim, tres trencaments (revisat per Van Hemel i Eussen, 2000).

Alteracions estructurals desequilibrades i estables

Les *delecions* es caracteritzen per la pèrdua d'un fragment cromosòmic. Les delecions terminals requereixen un trencament mentre que les intersticials requereixen dos (revisat per Shaffer i Lupski, 2000).

Els *isocromosomes* s'originen per un mecanisme de misdivisió del centròmer durant la divisió cel·lular o per un intercanvi tipus U entre cromàtides germanes, només aquest últim formaran isocromosomes dicèntrics (revisat per Shaffer i Lupski, 2000). Cada isocromosoma està format per dos braços, curts o llargs, genèticament idèntics.

Les *duplicacions* consisteixen en la duplicació d'un segment cromosòmic, generalment, dintre del mateix cromosoma. Normalment la regió duplicada es situa al costat de la original. S'originen per un intercanvi desigual entre cromosomes homòlegs (revisat per Shaffer i Lupski, 2000).

Els *cromosomes marcadors* són el resultat de reordenaments intracromosòmics i/o intercromosòmics complexes que dificulten la seva identificació amb bandes G (revisat per Shaffer i Lupski, 2000).

Alteracions estructurals desequilibrades i inestables

Els *fragments acèntrics* són fragments cromosòmics sense centròmer que normalment tendeixen a perdre's amb els successius cicles cel·lulars. Poden formar micronuclis (Mateuca *et al.*, 2006).

Les *translocacions dicèntriques* es produeixen a partir de dos cromosomes metacèntrics o submetacèntrics trencats que es fusionen, donant lloc a la formació d'un nou cromosoma amb dos centròmers (revisat per Stimpson *et al.*, 2012).

Els *cromosomes en anell* es formen com a resultat de dos trencaments en els extrems terminals dels braços p i q d'un mateix cromosoma i la seva posterior fusió (revisat per Daver *et al.*, 2012).

Alteracions cromosòmiques numèriques

Les aneuploidies són alteracions cromosòmiques numèriques que s'originen per la no disjunció o pèrdua anafàsica durant la divisió cel·lular (revisat per Thoma *et al.*, 2011 i per Gordon *et al.*, 2012; Fox i Duronio, 2013). Darrerament, s'ha descrit que les aneuploidies poden ser originades mitjançant diferents processos com defectes en el control de la unió al fus mitòtic o defectes en la cohesió cromosòmica (Compton, 2011). En els estudis de genotoxicitat només les hiperploïdies poden ser considerades com a mesura de l'aneuploïdia, degut a que la majoria de les pèrdues cromosòmiques es produeixen durant l'obtenció de les extensions cromosòmiques i es consideren artefactes (Albertini *et al.*, 2000).

3. Mecanismes de reparació del dany genotòxic

La gran importància que té per les cèl·lules mantenir la integritat del seu material genètic, front els nombrosos agents genotòxics, explica l'existència de diferents mecanismes de reparació de l'ADN que, independentment de l'etiologia de la mutació, garanteixen que una gran varietat de danys siguin corregits de manera efectiva (Decodier *et al.*, 2010). Hi ha quatre mecanismes principals de reparació de l'ADN: reparació d'aparellaments incorrectes (MMR), reparació per escissió de base (BER), reparació per escissió de nucleòtid (NER) i reparació de trencaments de doble cadena (DSBR) (Jackson *et al.*, 2009). Cada un d'aquests sistemes té un seguit de danys que és capaç de reconèixer i reparar, tal i com es recull a la Taula 2 (Hoeijmakers, 2001).

Taula 2. Mecanismes de reparació de l'ADN

Mecanismes de reparació	Tipus d'alteracions de l'ADN sobre els que actua	Errors en la reparació	
		Lesions cromosòmiques	Alteracions cromosòmiques estructurals
Mis-match repair (MMR)	Aparellaments incorrectes de nucleòtids	+	-
Reparació per escissió de base (BER)	Danys oxidatius	+	-
	Desaminacions		
	Despirimiditzacions		
Reparació per escissió de nucleòtid (NER)	Despurinitzacions	+	-
	Adductes		
	Enllaços creuats		
Sistema de reparació de trencaments de doble cadena (DSBR)	Dímers de pirimidina	+	+
	Ciclopurines		
	Trencaments		
	Danys oxidatius		

Els desaparellaments entre nucleòtids s'originen per desaminació de bases, oxidació, metilació, disfuncions de l'ADN polimerasa durant la replicació o per errors durant els processos de recombinació. Aquests desaparellaments són reparats pel sistema de *reparació d'aparellaments incorrectes*. No obstant, si no funciona de manera correcta pot generar lesions cromosòmiques i inestabilitat de microsatèl·lits entre d'altres (Caldecot, 2001; Kumari *et al.*, 2009).

La *reparació per escissió de bases* forma part de la resposta primària per corregir lesions de les bases nitrogenades, produïdes per danys oxidatius, alquilació, desaminació, despurinització, despirimidització i trencaments de cadena simple (Robertson *et al.*, 2009). El seu funcionament incorrecte genera un major nombre de lesions cromosòmiques (Collins *et al.*, 2001).

El mecanisme de *reparació per escissió de nucleòtid* corregeix una àmplia varietat de lesions: adductes d'ADN, enllaços creuats, dímers de pirimidina i danys oxidatius específics com les ciclopurines (Hoeijmakers, 2009). Aquest sistema s'encarrega principalment de la reparació de danys en l'ADN induïts per mutàgens exògens, de manera que la seva capacitat d'actuació pot ser un biomarcador útil en estudis de biomonitorització humana i en la predicció del càncer (Vande Lock *et al.*, 2010; Slyskova *et al.*, 2011). Un funcionament incorrecte d'aquest mecanisme de reparació pot induir la formació de lesions cromosòmiques (Vande Lock *et al.*, 2010; Slyskova *et al.*, 2011)

Hi ha dos sistemes de *reparació de trencaments de doble cadena*: la recombinació homòloga (HR) i la fusió no homòloga d'extremes (NHEJ) (Pardo *et al.*, 2009). El primer actua a les fases S i G2 del cicle cel·lular, és un mecanisme de reparació d'alta fidelitat, ja que restaura l'ADN danyat utilitzant seqüències homòlogues idèntiques a les originals (Zhu *et al.*, 2009). El segon mecanisme, NHEJ, semblant a l'anterior, consisteix en re-lligar directament els dos extrems del trencament però sense que hi hagi recombinació. Actua durant les fases G1 i S del cicle cel·lular, quan encara no hi ha una doble cadena homòloga que pugui ser utilitzada com a motllo (Pardo *et al.*, 2009). L'incorrecte funcionament dels sistemes de HR i NHEJ, genera un augment del nombre de lesions i alteracions cromosòmiques (Natarajan *et al.*, 2008).

Alguns agents genotòxics només són capaços de produir trencaments d'una cadena mentre que altres poden induir trencaments de doble cadena (Evans i Scott, 1969; Bender *et al.*, 1974; Natarajan *et al.*, 2008).

Independentment del mecanisme de reparació, si els trencaments d'una cadena no es reparen abans de la replicació o si són reparats de manera incorrecta, es transformen en trencaments de doble cadena. Si aquests no són reparats o són reparats incorrectament poden originar lesions cromosòmiques (gaps i trencaments) i alteracions cromosòmiques estructurals: inversions, anells, insercions, translocacions, delecions, alteracions cromosòmiques complexes, inestabilitat cromosòmica, etc (Mateuca *et al.*, 2006; revisat per Dauer *et al.*, 2010 i Selzer *et al.*, 2011).

Estudis recents han determinat la implicació dels sistemes de reparació de l'ADN (BER, NER i DSBR) en la reparació dels danys induïts pel benzè (Fig. 4). L'impacte de la carcinogènesi induïda pel benzè dependrà del tipus i freqüència de les lesions provocades, del sistema de reparació implicat i de la capacitat de reparació de l'òrgan o teixit diana (Hartwig, 2010).

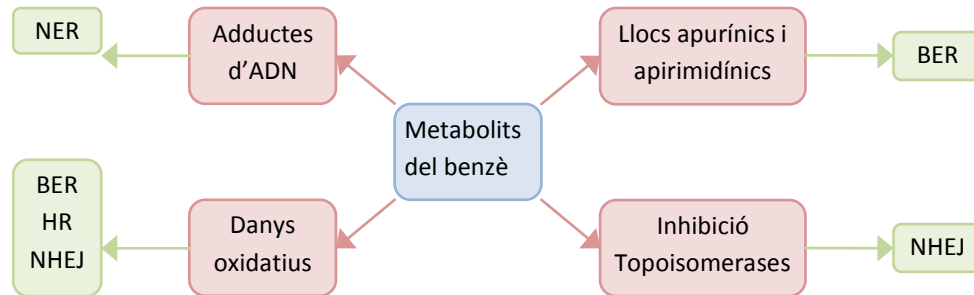


Figura 4. Sistemes de reparació implicats en l'eliminació dels danys induïts pel benzè. BER: reparació per escissió de base; NER: reparació per escissió de nucleòtid; HR: recombinació homòloga; NHEJ: unió no homòloga d'extremes (modificada de Hartwig, 2010).

4. Alteració de la reparació de l'ADN: cultius amb afidicolina

L'afidicolina és una micotoxina diterpenoid tetracíclica que actua inhibint les ADN polimerases α , δ i ϵ (Glover *et al.*, 2005; Palakodeti *et al.*, 2010). Aquestes polimerases formen part de la maquinària de replicació i de reparació de l'ADN com la reparació per escissió de nucleòtids i per escissió de base (Fortini *et al.*, 2003; revisat Lukusa i Fryns, 2008; Slyskova *et al.*, 2011; Speit *et al.*, 2013).

Quan actua sobre la maquinària de la replicació, disminueix la velocitat de la replicació general del genoma, fent que la forqueta de replicació progressi més lentament, o que, fins i tot, s'aturi (Fig. 5). La parada de la replicació dona lloc a trencaments de doble cadena de l'ADN (Speit i Schütz, 2008; Palakodeti *et al.*, 2010).

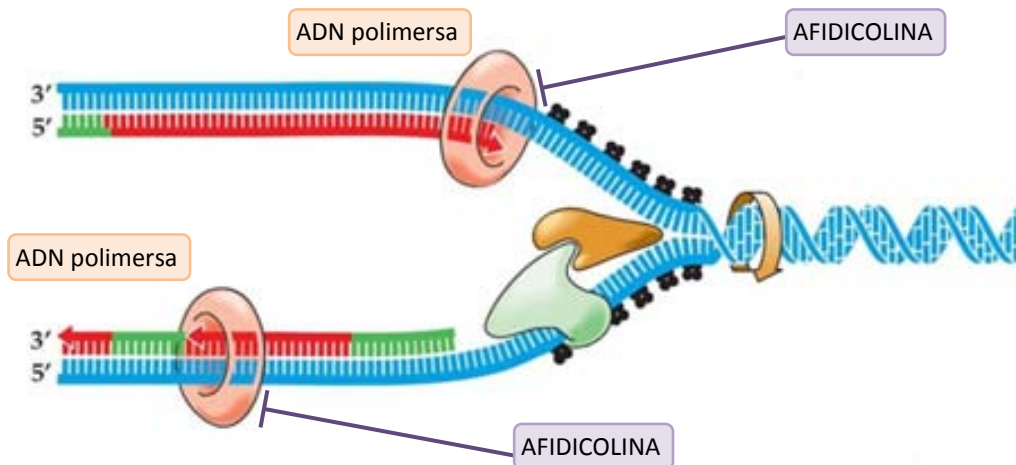


Figura 5. Representació de la inhibició de l'ADN polimerasa per l'afidicolina.

L'augment dels trencaments induïts per l'afidicolina pot ser mesurat mitjançant l'assaig cometa, lesions i alteracions cromosòmiques i formació de micronuclis (Speit i Schütz, 2008; Palakodeti *et al.*, 2010). De tots aquests biomarcadors, les lesions cromosòmiques són les que tenen una major sensibilitat en la detecció dels danys generats per l'afidicolina (Speit *et al.*, 2004; Speit i Schütz, 2008). Aquesta major susceptibilitat pot ser deguda a l'existència d'una exposició prèvia a altres agents genotòxics o a factors genètics individuals. Es calcula que aproximadament un 7% dels individus són hipersensibles a l'efecte de l'afidicolina (Tedeschi *et al.*, 2004; Speit *et al.*, 2004; Hubeek *et al.*, 2005; Tiwari *et al.*, 2008). En general, un augment del nombre de lesions cromosòmiques en presència d'afidicolina, implica un major efecte de l'agent mutagen (Tedeschi *et al.*, 2004).

Es considera que aquest inhibidor de les polimerases ajuda a detectar lesions no reparades, i per tant, permet comprovar el correcte funcionament dels sistemes de reparació del genoma (Vande Lock *et al.*, 2010). Darrerament, l'estudi de Fujita *et al.* (2013) ha evidenciat que l'afidicolina, en funció de la seva concentració, induiria trencaments cromosòmics no associats a trencaments de doble cadena de l'ADN que no estarien subjectes a les principals vies de reparació de trencaments de doble cadena (HR i NHEJ).

Per últim, la major part dels llocs fràgils comuns són especialment induïts per l'afidicolina encara que s'observen, a baixa freqüència, amb l'addició de bromodeoxiuridina (BrdU) i azacitidina (revisat per Durkin i Glover, 2007).

5. Exposició al fuel abocat pel petrolier Prestige

El 13 de novembre de 2002 el Prestige, un petrolier de 30 anys d'antiguitat, que operava per a una companyia grega, navegava amb 77.000 tones de fuel a 50 km de Fisterra, quan un gran temporal va fer que s'obris una important via d'aigua, provocant danys estructurals greus. Front el risc de contaminar una de les primeres regions productores de musclo, a nivell mundial, les autoritats portuàries decideixen remolcar la nau lluny de la costa, fins que el dia 19 de novembre, a 250 km mar endins, el petrolier es va enfonsar (Fig. 6) (http://marenostrum.org/ecologia/medio_ambiente/prestige/).



Figura 6. Petrolier Prestige en el moment de partir-se per la meitat.

Degut a l'accident, 63.000 tones de fuel van ser vessades al mar, afectant més de 1.000 km de les costes gallegues, asturianes, cantàbriques, basques i franceses (Fig. 7) (Bosch, 2003). La contaminació va ser molt àmplia i heterogènia. Les característiques de la costa, les condicions climàtiques i les corrents marines van fer que la contaminació afectés de manera desigual les diferents zones (Albaigés *et al.*, 2006).



Figura 7. Imatge de la contaminació de les costes gallegues pel vessament del Prestige.

Davant l'absència d'un pla de contingència per aquest tipus de catàstrofes, les tasques de neteja del fuel es basaren en la massiva resposta de milers de voluntaris. Els primers en respondre van ser els pescadors i mariscadors de la zona, junt amb les seves famílies que no disposaren de cap mena d'equip de protecció. Poc després es van incorporar voluntaris vinguts de Galícia, la resta d'Espanya i d'Europa. Per últim, es van incorporar empreses de gestió de residus i l'exèrcit. En total, unes 300.000 persones van participar en la neteja de les costes gallegues (Fig. 8).



Figura 8. Voluntaris participant en les tasques de neteja del fuel.

5.1. Característiques del fuel vessat

El Prestige transportava fuel nº2 que es caracteritza per una elevada densitat, alta viscositat, alt contingut en sofre (4%), poca tendència a dispersar-se formant emulsions estables amb l'aigua i una capacitat de biodegradació inferior al 10% durant els primers mesos (Informe técnico CSIC Prestige nº1, CSIC 2003).

La seva composició era d'un 50% d'hidrocarburs aromàtics entre quals hi havia hidrocarburs volàtils, hidrocarburs aromàtics policíclics i hidrocarburs d'elevat pes molecular. A la Taula 3 s'especifica quins d'aquests components es consideren carcinògens. La resta de compostos químics consistien en un 22% d'hidrocarburs saturats, un 28% de resines i asfaltens, heteromolècules amb sofre, oxigen i nitrogen i elevats continguts de metalls pesats com cadmi, plom i níquel que també presenten propietats carcinogèniques i poden afectar el sistema endocrí.

Taula 3. Composició química del fuel vessat pel petrolier Prestige i la seva classificació com carcinogen humà

Composició fuel petrolier Prestige		Classificació IARC	
50% Hidrocarburs aromàtics	Hidrocarburs volàtils	Toluè	No carcinògen
		Xilè	No carcinògen
		Benzè	Carcinògen
	Hidrocarburs aromàtics policíclics	Naftalè	Possibles carcinògens
		Benzofluorantè	
		Alquil-derivats	
	Hidrocarburs d'elevat pes molecular	Benzoantracè	Possible carcinògen
		Benzopirè	Carcinògen
		Dibenzoantracè	Probable carcinògen
22% Hidrocarburs saturats			
28% Resines i asfaltens			

IARC (International Agency for Research on Cancer)

5.2. Efectes de l'exposició als vessaments de fuel

Els efectes adversos dels accidents de petroliers sobre la flora i la fauna han estat molt estudiats. En canvi, els estudis sobre els possibles efectes en la salut de les persones exposades al fuel són escassos i, normalment, es centren en els efectes aguts (problemes respiratoris, irritació de la pell, mal de cap, etc) i els símptomes psicològics.

Des de 1967, s'ha anat construint una base de dades sobre els vessaments de petroliers més importants (www.itopf.com), on es recull la quantitat i tipus de fuel, la causa de l'accident i la seva ubicació. Des de 1989 s'han produït 9 grans vessaments: Exxon Valdez, Braer, Sea Empress, Nakhodka, Erika, Prestige, Tasman Spirit, Hebei Spirit i Deepwater Horizon.

La catàstrofe del Prestige ha estat una de les més estudiades, degut al gran impacte que va suposar, tan a nivell mediambiental (impacte en l'ecosistema i les diferents espècies marines afectades) com socioeconòmic (Bosch, 2003; Pérez-Cadahía *et al.*, 2004; Albaigès *et al.*, 2006; Laffon *et al.*, 2006a; Morales-Caselles *et al.*, 2008; Velando *et al.*, 2010; Garmendia *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2011). Els estudis sobre els efectes en la salut de les persones que van realitzar tasques de neteja del fuel, es van dur a terme principalment a Galícia, per ser la zona més afectada (Laffon *et al.*, 2006b; Carrasco *et al.*, 2007; Zock *et al.*, 2007; Pérez-Cadahía *et al.*, 2007, 2008a, 2008b, 2008c; Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Sabucedo *et al.*, 2010; Zock *et al.*, 2011; Monyarch *et al.*, 2013). No obstant, també trobem alguns estudis equivalents en Astúries i Cantàbria (Suárez *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2006; Castanedo *et al.*, 2009).

Respecte als efectes psicològics, diversos estudis demostren un augment del nombre de desordres d'ansietat, desordres d'estrès post-traumàtic i empitjorament de la salut psicològica (Palinkas *et al.*, 1992, 1993 i 2004; Lyons *et al.*, 1999; Galacher *et al.*, 2007). En el cas del Prestige, els individus propers a la zona del vessament, presentaven un augment dels símptomes psicopatològics, com angoixa, que no es traduïa en una simptomatologia clínica rellevant (Taula 4). El suport social, la participació en la solució del problema i els ajuts econòmics rebuts van mitigar en part els danys psicològics causats per l'accident (Carrasco *et al.*, 2007; Sabucedo *et al.* 2010).

Els principals efectes sobre la salut de l'exposició aguda al fuel han estat: mal de cap, irritació de gola i ulls, cansament, febre, dermatitis, dolor a la regió lumbar i les cames, deteriorament de la funció pulmonar i desordres respiratoris (Crum *et al.*, 1993; Campbell

et al., 1993 i 1994; Lyons *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 1999; Baars *et al.*, 2002; Dor *et al.*, 2003; Janjua *et al.*, 2006; Meo *et al.*, 2008; Kurshid *et al.*, 2008; Sim *et al.*, 2010). En la catàstrofe del Prestige es van observar els mateixos símptomes que en els estudis anteriors. Els pescadors que van treballar en zones molt contaminades, van rebre menys informació sobre les mesures de protecció i presentaven més problemes de salut que aquells que havien estat correctament informats (Suárez *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2006, 2007; Sabucedo *et al.*, 2010).

Taula 4. Efecte en la salut de les persones que van participar en tasques de neteja del fuel del Prestige

Publicació	Efectes en la salut en individus exposats
Suárez <i>et al.</i> , 2005	Augment del risc de ferides
	Dolor a l'esquena
	Mal de cap
	Irritació de la pell
Carrasco <i>et al.</i> , 2006	Mals de cap
	Problemes respiratoris
Carrasco <i>et al.</i> , 2007	Augment símptomes psicopatològics
Sabucedo <i>et al.</i> , 2010	Augment símptomes psicopatològics
	Pitjor percepció de la salut i de la capacitat funcional sense una simptomatologia clínica rellevant

VOC, compostos orgànics volàtils; PHA, hidrocarburs aromàtics policíclic

Hem de destacar la importància de la última catàstrofe d'aquestes característiques, l'explosió de la plataforma petrolífera Deepwater Horizon al 2010. El National Institut of Environmental Health Sciences (NIEHS) ha iniciat la major investigació mai feta sobre les conseqüències en la salut de la neteja d'un vessament de fuel (55.000 persones exposades i 5.000 controls). El disseny inclou una primera fase entre 18 i 24 mesos després del vessament, una segona fase als 5 anys i es contempla una tercera als 20 anys de la catàstrofe (Reardon, 2011). Com en les altres accidents, els estudis inicials han confirmat el seu impacte psicològic en les poblacions afectades (Na *et al.*, 2010; Grattan *et al.*, 2011; Osofsky *et al.*, 2011; Buttke *et al.*, 2012).

Degut a la importància de les catàstrofes anteriorment citades, s'han publicat diverses revisions sobre els efectes en la salut de la exposició aguda al fuel (Ha *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2010; Monyarch, 2010; Goldstein *et al.*, 2011).

5.2.1. Efectes genotòxics de l'exposició aguda al fuel

Els estudis existents sobre els efectes genotòxics de l'exposició aguda al fuel són molt escassos. Abans de l'accident del Prestige, només es van publicar cinc articles que analitzaven l'efecte del fuel vessat per un vaixell en un port d'Anglaterra (Clare *et al.*, 1984), el Braer a Escòcia (Cole *et al.*, 1997) i l'Erika a França (Lemiere *et al.*, 2005; Amat-Bronnert *et al.*, 2007; Chaty *et al.*, 2008).

En l'estudi dut a terme per Clare *et al.* (1984) es va analitzar el nombre d'alteracions cromosòmiques i d'SCE, en mostres de sang perifèrica de 10 treballadors del vaixell, que van estar altament exposats al fuel. Les mostres van ser recollides tres mesos després de l'accident i no es va trobar cap associació entre l'exposició al fuel i els danys cromosòmics.

En l'estudi de l'accident del petrolier Braer (Cole *et al.*, 1997) es va determinar la presència d'adductes a l'ADN i de mutacions en el gen HPRT en 20 persones exposades al fuel i 7 controls, en el moment de l'exposició, a les 10 setmanes i als 10 mesos. No es van trobar diferències estadísticament significatives en cap dels paràmetres estudiats.

L'efecte de l'exposició al fuel vessat pel petrolier Erika, es realitzar en estudis *in vitro* de cèl·lules de l'epiteli bronquial i cèl·lules hepàtiques humanes. L'activació metabòlica per part dels complexos enzimàtics CYP, COX i LOX, produïen adductes a l'ADN en el teixit hepàtic, es a dir, l'exposició al fuel era genotòxica (Amat-Bronnert *et al.*, 2007). Lemiere *et al.* (2005) i Chaty *et al.* (2008) van analitzar la genotoxicitat en rates alimentades amb musclos contaminats pel fuel. Lemiere *et al.* (2005) van trobant un augment del dany en l'ADN, mitjançant l'assaig cometa, en cèl·lules hepàtiques i de la medul·la òssia però no en cèl·lules sanguínies. Chaty *et al.* (2008) van constatar la inducció transitòria de l'expressió del gen CYP1A1 i de l'activitat de la proteïna EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) en el fetge, que són responsables de la transformació dels hidrocarburs aromàtics policíclics en metabòlits genotòxics.

Estudis genotòxics sobre la catàstrofe del Prestige

La major part dels estudis genotòxics s'han realitzat a partir de la catàstrofe del Prestige. En un estudi preliminar dut a terme durant les primeres setmanes de l'accident del Prestige es va avaluar el dany genotòxic mitjançant l'assaig cometa, test de MN i SCE (Gestal *et al.*, 2004). En aquesta anàlisi es va trobar un augment en la quantitat de danys a l'ADN en els individus exposats al fuel amb l'assaig cometa i amb SCE.

La major part d'estudis genotòxics han estat realitzats a la Universitat de A Coruña per l'equip de Blanca Laffon. Un dels primers en publicar-se va analitzar mitjançant l'assaig cometa i el test de MN els voluntaris que van estar netejant aus (Laffon *et al.*, 2006a). En aquest estudi es va observar un petit increment de la llargada de la cua del cometa en els individus exposats associat al temps d'exposició, l'edat i el sexe. No es va trobar un augment significatiu en la freqüència de MN, exceptuant aquells individus exposats que no van fer servir mascaretes durant la realització de les tasques de neteja. En aquest mateix treball es va estudiar el possible efecte dels polimorfismes dels gens implicats en la reparació de l'ADN (XRCC1 i APE1), observant-se que les variants XRCC1 399Gln i APE1 148Glu afecten la possibilitat de presentar danys en individus tan exposats com no exposats (Laffon *et al.*, 2006a).

A continuació, aquest mateix grup, va estudiar els efectes del fuel en les persones que desenvoluparen tasques de neteja de platges i roques, (Pérez-Cadahía *et al.*, 2006 i 2007), prèviament les van classificar en funció del tipus de feina realitzada en: voluntaris (V), treballadors manuals (MW) i treballadors amb màquines de vapor a pressió (HPW). Van observar un augment d'SCE als HPW, no es va trobar cap efecte amb el test de MN i amb l'assaig cometa es va observar un augment dels nivells de trencaments en V i HPW i en exposats en general. Els nivells de prolactina disminuïen en el grup d'HPW i els de cortisol a tots 3 grups. Per últim, els individus portadors de la deleció dels dos al·lels GSTM1 mostraven un nombre major d'SCE, nivells superiors de cortisol i inferiors de prolactina.

A l'estudi de Pérez-Cadahía *et al.* (2008a) es va determinar la relació entre les concentracions de metalls pesats i paràmetres citogenètics (test de MN, assaig del cometa i SCE) i endocrins. Van analitzar el paper d'alguns dels gens polimòrfics implicats en la metabolització del benzè i en els mecanismes de reparació de l'ADN (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008b). Posteriorment, van estudiar la relació entre els efectes en l'ADN i diferents paràmetres endocrins (concentració en sang de prolactina i cortisol). Van constatar un augment en el dany, detectat amb l'assaig cometa, en tots els grups exposats al fuel en

relació amb els controls. En els individus exposats les variants al·lèliques CYP1A1 i EPHX1-139 augmenten els nivells de dany a l'ADN, la variant EPHX1 113 no afecta la sensibilitat al dany i la variant GSTP1 afavoreix la disminució del dany genètic (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008c). Per últim, Valdiglesias *et al.* (2012) va estudiar l'efecte genotòxic en rates exposades a la inhalació de fuel, observant un augment dels danys en l'ADN (detectats mitjançant l'assaig cometa) i l'alteració dels sistemes de reparació (assaig de sensibilitat a mutàgens).

A la Taula 5 s'indiquen les principals publicacions sobre l'efecte genotòxic en els individus que van participar en la neteja del fuel del Prestige.

Taula 5. Principals estudis de l'efecte genotòxic de l'exposició al fuel abocat pel Prestige

Publicacions	Efectes genotòxics en exposats al fuel
Gestal <i>et al.</i> , 2004	Augment danys (assaig cometa i SCE)
	Augment danys (assaig cometa)
Laffon <i>et al.</i> , 2006	Al·lel XRCC1-399Gln més susceptibles al dany Al·lel APE1-148Glu menys susceptibles al dany
Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2006	Augment danys (assaig cometa)
Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2007	HPW augment danys (SCE) Deleció GSTM1: augment danys (SCE)
Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2008a	Metalls pesats augment danys (assaig cometa) Cd augment danys (test MN)
	MW augment danys (test MN)
Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2008b	Al·lells CYP1A1, EPHX1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, XRCC3 i XPD afecten nivell de danys
Pérez-Cadahía <i>et al.</i> , 2008c	Augment nivells Al i Ni i de danys (assaig cometa) Al·lells CYP1A1 i EPHX1: augment danys Al·lells GSTP1, GSTM1 i GSTT1: disminució danys
Valdiglesias <i>et al.</i> , 2012	Rates exposades a fuel inhalat: augment danys (assaig cometa i test MN) i alteració reparació ADN

SCE: intercanvi de cromàtides germanes; MN: micronuclis; E: exposats; MW: treballadors manuals; HPW: treballadors amb màquines d'alta pressió; Cd: cadmi; Zn: zinc

5.3. Projecte SEPAR-Prestige

El projecte en el qual està inserida la present investigació començà a gener de 2003, impulsat per la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Es va constituir un equip investigador, multicèntric i multidisciplinar amb: pneumòlegs, epidemiòlegs, toxicòlegs, especialistes en medicina laboral i genetistes.

L'estudi es va dissenyar de forma transversal, en diverses fases consecutives, amb l'objectiu de determinar els possibles efectes de l'exposició al fuel en una ampla població, centrant-se especialment en tres qüestions:

- Efectes respiratoris a nivell clínic-funcional
- Presència de marcadors biològics d'inflamació i d'estrès oxidatiu en les vies respiratòries
- Genotoxicitat en sang perifèrica

Des d'un primer moment aquest projecte comptà amb l'ajuda econòmica de SEPAR i posteriorment es van anar afegint el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI03/1685 i PI07-0086), el Centro Respira de Investigación (CRI), la Red Respira (RTIC, 03/11), Centro de Investigación Red de Enfermedades Respiratorias y de Neoplasia Torácica (CIBERES), CIBER Epidemiologia y Salud Publica (CIBERESP), Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2009SGR-1107). Finalment també es va afegir el propi Servicio de Salud Gallego (SERGAS).

5.3.1. Estudi inicial: Prestige I

Fase I de l'estudi

En la primera fase es va procedir a determinar el grup d'individus exposats (E) i no exposats (NE), en funció de la zona de residència, per fer-ho es va demanar informació a la Delegación de Pesca Gallega que ens va facilitar el llistat de les 63 confraries existents a Galícia. D'aquestes, es van excloure des d'un primer moment les de A Coruña, Ferrol, Vigo i Pontevedra per evitar el possible efecte de la contaminació atmosfèrica d'aquests nuclis urbans, d'altres confraries es van descartar per no poder disposar del cens complet dels seus mariners, també es van descartar els pescadors d'altura i els mariners mercants.

Per tal d'identificar si existeix una associació entre les tasques de neteja del fuel i el lloc de residència amb un major risc de presentar símptomes respiratoris es va realitzar un primer

qüestionari on es demanava informació quantitativa i qualitativa sobre tasques de neteja, símptomes respiratoris, problemes de salut i ansietat, medicació actual i subjectivitat dels efectes que el vessament havia causat, junt amb les dades personals per poder contactar amb els participants en fases posteriors de l'estudi.

Aquest qüestionari es va enviar a 10.000 pescadors, obtenint-se un total de 6780 respostes procedents de 38 confraries diferents. Aquesta informació va permetre comprovar que quasi dos anys després persistien els símptomes respiratoris en les persones que havien participat en les tasques de neteja (Zock *et al.*, 2007). Aquests símptomes presentaven una clara associació amb els diferents tipus d'activitats desenvolupades, el risc augmentava amb la duració del treball i el nombre de tasques realitzades, i disminuïa amb l'augment del temps transcorregut des de la realització de la última tasca. Aquest estudi, el primer d'aquestes característiques, suggeria l'existència d'efectes respiratoris prolongats i possiblement persistents en el temps.

A partir del qüestionari i l'estudi epidemiològic es va definir la població d'estudi, fixant els criteris d'inclusió i exclusió, de 38 confraries, distribuïdes al llarg de la costa Gallega, des de la Costa da Morte, més afectada, fins a la província de Lugo, menys afectada (Fig. 9).



Figura 9. Distribució de les confraries a la costa gallega, molt exposades en vermell i poc exposades en negre.

Fase II de l'estudi

Un cop seleccionada la població d'estudi es va marcar com a objectiu comparar els grups E i NE per estudiar l'associació entre l'exposició al fuel i els efectes a nivell respiratori, immunològic i genotòxic. Aquesta fase es va desenvolupar entre juliol de 2004 i febrer de 2005 i van participar 678 pescadors i mariscadors (501E i 177NE). Per portar-la a terme es va fer servir una Unitat Mòbil que es desplaçava diàriament a les diferents confraries i que realitzava diferents proves:

- Qüestionari complet: salut, símptomes, hàbits (tabac), feina actual, història laboral, condicions de l'habitatge i feines desenvolupades durant la neteja del fuel
- Qüestionari sobre la funció pulmonar
- Qüestionari sobre la qualitat de vida
- Proves de funció pulmonar
 - Espirometria basal forçada
 - Broncoprivació amb metacolina
 - Prova broncodilatadora
- Prova cutània d'al·lèrgia: Prick test
- Extracció d'aire exhalat per l'anàlisi de biomarcadors d'estrès oxidatiu i de biomarcadors d'inflamació
- Extracció de sang per l'anàlisi d'IgE
- Extracció de sang per l'anàlisi de genotoxicitat

Per a la inclusió en l'estudi de marcadors d'inflamació i d'aire condensat exhalat, a més dels criteris abans esmentats, els participants en l'estudi havien de no haver sigut mai fumadors. En el cas dels individus per a l'estudi genotòxic, havien de complir quatre criteris addicionals: no haver sigut mai fumadors, ser de fertilitat provada (tenir al menys un fill), no tenir antecedents de càncer i no haver estat exposats a altres agents genotòxics de forma habitual.

Els resultats obtinguts a nivell de la funció pulmonar destaquen una prevalença dels símptomes respiratoris en els pescadors i mariscadors que van participar en les tasques de neteja (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010). S'observà que els components del fuel poden actuar com a irritants respiratoris, augmentant la reactivitat bronquial, es va trobar una relació clara entre el grau d'exposició i la presència de símptomes i una tendència a la disminució dels símptomes a mesura que augmentava el temps transcorregut des de l'exposició.

Respecte als marcadors d'inflamació respiratòria i d'estrès oxidatiu es va detectar un augment dels nivells de 8-isoprostane i de la seva activitat en l'EBC, que reflecteixen l'augment de l'estrès oxidatiu que, junt amb la inflamació corresponent, generen radicals lliures que són els responsables de l'envelliment cel·lular. En aquest cas també es va trobar una clara relació entre el grau d'exposició i el risc de presentar símptomes (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010).

En relació als estudis sobre genotoxicitat, no es van trobar diferències estadísticament significatives entre E i NE en el nombre de lesions cromosòmiques, però sí es va detectar en els individus E un augment del nombre d'alteracions cromosòmiques estructurals, especialment desequilibrades (cultius de 72 h) que a més està directament associada al grau d'exposició (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, 2010). Es va analitzar la distribució dels punts de trencament implicats tan en les lesions com en les alteracions cromosòmiques estructurals, comprovant-se que aquesta no era homogènia, es van identificar aquelles bandes que estaven especialment afectades per l'exposició al fuel: 2q21, 3q27 i 5q31, totes tres implicades en càncers hematològics (Monyarch, 2010; Monyarch *et al.*, 2013).

5.3.2. Estudi de seguiment: Prestige II

Vist els resultats obtinguts en l'estudi inicial i donada la seva importància a nivell sanitari, es decideix fer un estudi de seguiment per poder determinar si els efectes detectats, o alguns d'ells, persisteixen, augmenten o disminueixen amb el temps. L'estudi de seguiment es va dur a terme entre 5 i 6 anys després de l'exposició. Durant els mesos de juny i juliol de 2008 es van repetir els qüestionaris a 622 mariners, i entre novembre de 2008 i abril de 2009 la Unitat Mòbil es va desplaçar per les diferents confraries recollint les mostres pels estudis d'inflamació respiratòria, estrès oxidatiu i genotoxicitat i fent proves per l'estudi de la funció pulmonar (Zock *et al.*, 2012). Fins ara és l'únic estudi de seguiment d'una població exposada de forma aguda al fuel.

Amb l'estudi epidemiològic, s'ha pogut constatar que els símptomes de les vies respiratòries han disminuït lleugerament respecte al Prestige I, malgrat que encara hi ha una associació entre la intensitat de l'exposició i la presència de símptomes, a més s'ha pogut determinar que els individus NE amb problemes respiratoris estan sobre-representats, la qual cosa pot afectar els resultats obtinguts, evidenciant la importància de la no inclusió d'individus nous en els estudis de seguiment (Zock *et al.*, 2012).

Respecte a l'estudi dels efectes a nivell genotòxic, en cultius estàndards de 72 h, Hildur (2012) va detectar una disminució en la freqüència d'alteracions cromosòmiques estructurals en els individus exposats al fuel, però que tot i així es manté molt per sobre dels valors esperats en la població general. En la Figura 10 es mostren les proves de selecció d'individus en els estudis de genotoxicitat tant del Prestige I com del Prestige II. Altra part de l'estudi genotòxic, està inclosa en aquesta tesis.

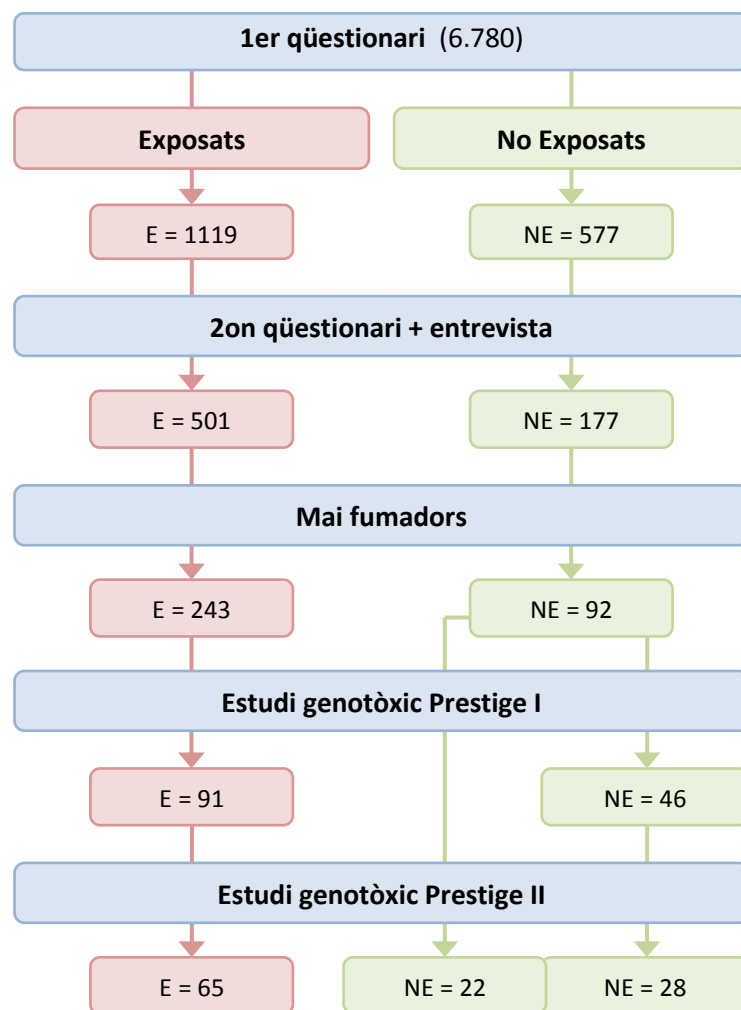


Figura 10. Procés de selecció d'individus per a l'estudi de genotoxicitat del Prestige I i Prestige II.

Objectius

Objectius

En l'estudi previ, realitzat pel nostre grup (Prestige I), es va detectar un increment de les alteracions cromosòmiques estructurals en els individus exposats al fuel (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, tesis doctoral, 2010). Donada l'associació existent entre l'augment de les alteracions cromosòmiques i el risc a desenvolupar càncer, ens varem proposar estudiar si l'efecte genotòxic persisteix transcorreguts sis anys des de l'exposició (Prestige II).

Aquest objectiu general compren els següents objectius concrets:

1. Analitzar les lesions i alteracions cromosòmiques estructurals, mitjançant cultius de limfòcits de 48 h d'individus exposats i no exposats al fuel
2. Detectar si hi ha diferències en el dany cromosòmic en ambdós grups d'individus, exposats i no exposats, per conèixer l'efecte de l'exposició al fuel.
3. Determinar si existeixen bandes cromosòmiques especialment sensibles al fuel.
4. Comparar el nostres resultats amb els obtinguts en els estudis previs del Prestige per determinar si:
 - El temps de cultiu dels limfòcits influeix en el grau de dany cromosòmic detectat
 - Persisteix l'efecte genotòxic sis anys després de l'exposició al fuel
5. Valorar si l'increment del dany cromosòmic és degut a errors de reparació de l'ADN, mitjançant cultius de limfòcits tractats amb un inhibidor de l'ADN polimerasa (afidicolina).

Materials i mètodes

1. Participants en l'estudi de genotoxicitat

El present treball (Prestige II) forma part d'un estudi general de seguiment dels pescadors i mariscadors gallegos exposats al fuel que s'ha realitzat sis anys després de l'exposició.

Els criteris de selecció dels individus exposats (E) i no exposats (NE) al fuel han estat els mateixos que els emprats en l'estudi anterior (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, 2010; Monyarch *et al.*, 2013). Breument, aquest criteris d'inclusió (tan al Prestige I com al Prestige II) han estat:

Grup E:

- Ser pescadors i mariscadors d'una de les 15 confraries més afectades de la costa atlàntica
- Haver participat com a mínim 15 dies en les activitats de neteja
- Durant 4 hores o més al dia
- Durant el període de màxima contaminació, entre novembre i desembre de 2002

Grup NE:

- Ser pescadors i mariscadors d'una de les 16 confraries menys afectades de la costa cantàbrica
- No haver participat en les tasques de neteja per raons alienes a la seva salut

Criteris addicionals de l'estudi de genotoxicitat:

- No ser fumadors
- Ser fèrtils (tenir com a mínim un/a fill/a)
- No haver estat exposat a altres agents tòxics de forma habitual
- No patir, ni haver patit càncer

Dels 137 individus (91E i 46NE) que van participar en l'estudi de genotoxicitat del Prestige I, només 83 individus han participat en l'estudi de seguiment (Prestige II). A més, per tal d'igualar el nombre de E i NE de l'estudi, es va decidir incloure 21 nous individus NE que complien tots el criteris abans esmentats, així en total han estat analitzats 104 individus (58E i 46NE) (Fig. 11).



Figura 11. Imatges dels pescadors que van participar en les tasques de neteja.

En un subgrup de participants, es va realitzar l'estudi citogenètic en cultius tractats amb afidicolina, 44 individus a Prestige I (22E i 22NE) i 18 d'aquests individus a Prestige II (8E i 10NE), de manera que tots els casos estudiats a Prestige II havien estat analitzats prèviament.

Tots els individus van signar el full de consentiment per a la participació en l'estudi de genotoxicitat, que prèviament havia estat aprovat pel Comité Ètic d'Investigacions Clíniques de Galícia.

El nombre d'individus que ha participat en els diferents estudis del Prestige I i del Prestige II es recullen de manera detallada en la Figura 12.

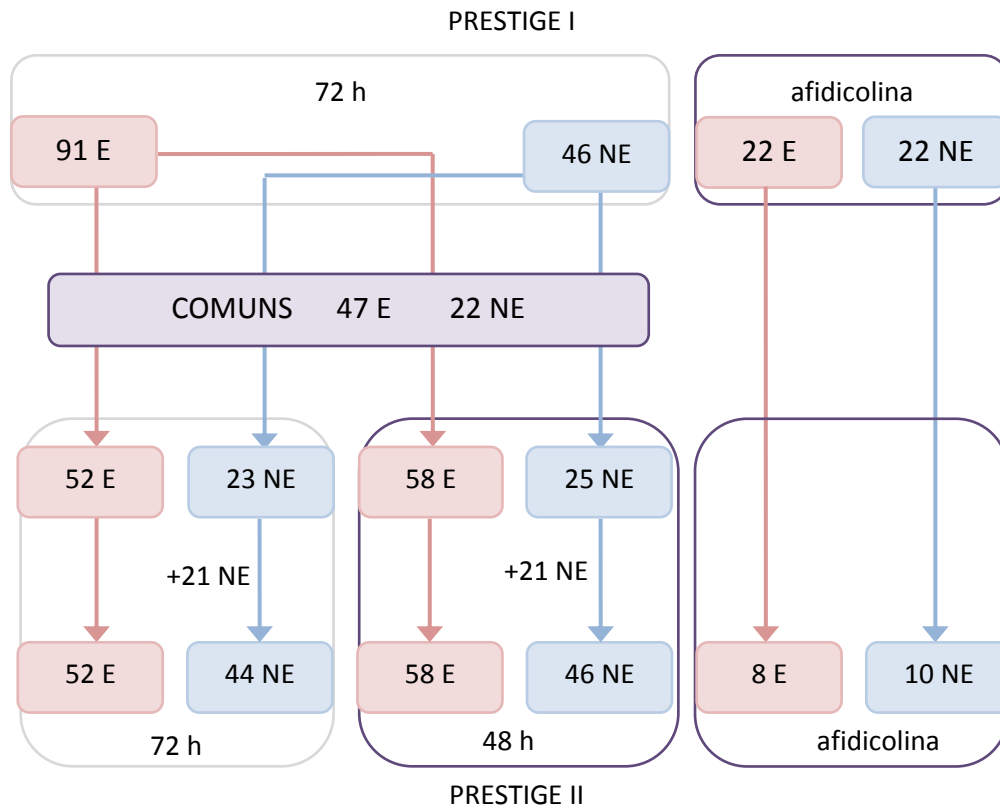


Figura 12. Esquema dels individus que han participat en els diferents estudis del Prestige I i del Prestige II, mostrant els individus comuns als tres estudis.

2. Tipus de mostra, recollecció i transport

S'han estudiat mostres de sang perifèrica (3-5 ml) obtingudes en tubs estèrils amb heparina sòdica al 0,1% (Rovi) com anticoagulant. En aquest estudi es va emprar la mateixa estratègia i logística en la recollida de mostres que la utilitzada en el Prestige I (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, 2010; Monyarch *et al.*, 2013).

L'obtenció de les mostres es va a relitzar a una Unitat Mòbil que es desplaçava des del *Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña* (antic Hospital Juan Canalejo) fins a les diferents confraries. Les mostres eren transportades a l'hospital on es guardaven fins el seu posterior enviament (2 cops a la setmana) fins a la Universitat Autònoma de Barcelona, a més de 1.000 km de distància, on es realitzaven els cultius de limfòcits.

Per tal de minimitzar el deteriorament de les mostres i garantir la viabilitat dels limfòcits i el seu creixement en cultiu, tan la conservació com el transport de les mostres es realitzava en neveres que mantenien una temperatura constant de 4° C. Per detectar possibles

alteracions en la cadena de fred, les mostres s'enviaven en un recipient conegut com Biotaines E Còrtex, provist d'un termòmetre (dispositiu WarmMark) que ens permetia saber si s'havien produït variacions en la temperatura durant el transport.

En alguns enviaments la temperatura va baixar de 0° C i en aquests casos no es va aconseguir un bon creixement cel·lular en els cultius de limfòcits.

Les mostres eren marcades a la Unitat Mòbil mitjançant un número d'identificació de 6 dígits, i després al laboratori de la UAB se'ls hi assignava un nou número d'identificació de 3 dígits per facilitar el seu etiquetatge. D'aquesta manera, el personal del laboratori desconexíem la procedència de la mostra (si era un individu E o NE), i es va realitzar l'anàlisi citogenètica de les mostres "a cegues".

La recollida i trasllat de les mostres va ser portada a terme entre novembre de 2008 i abril de 2009 (entre 6 anys i 6 anys i mig després del vessament del fuel).

3. Processament de les mostres: cultiu de limfòcits

En l'estudi global del Prestige II, per cada individu es van realitzar cultius de limfòcits amb medi RPMI-1640. Per poder analitzar diferents biomarcadors de genotoxicitat, es van emprar quatre tipus de condicions de cultiu que diferien en el temps de cultiu o en l'addició d'agents químics (Fig. 13):

- Cultius de 48 h, estudi citogenètic clàssic de genotoxicitat (present estudi).
- Cultius de 72 h (Hildur, 2012)
- Cultius de 72 h amb addició de citocalasina B, per l'obtenció de cèl·lules binucleades i l'anàlisi de micronuclis (pendent d'estudi)
- Cultius de 96 h amb addició d'afidicolina, per l'estudi dels errors de reparació de l'ADN (present estudi)

Tots aquests cultius es van realitzar per duplicat, es a dir, en total per cada individu es realitzaven 8 cultius cel·lulars.

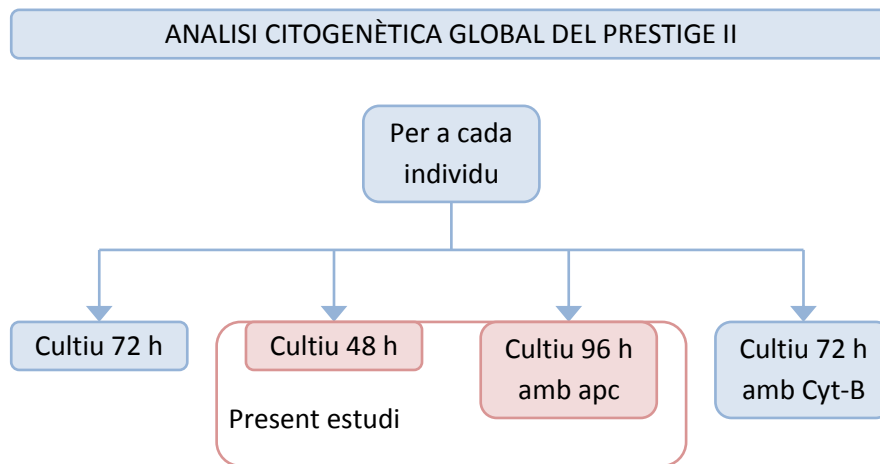


Figura 13. Tipus de cultius de limfòcits utilitzats en l'estudi global del Prestige II (apc: afidicolina, Cyt-B: citocalasina B).

La Taula 6 mostra la complexitat de la recollida de les mostres i del seu processament. La Unitat Mòbil a Galícia recollia mostres dilluns i dimarts (enviades dimecres) i dimecres i dijous (enviades divendres). El nostre laboratori rebia i sembrava els cultius cada dijous i cada dissabte, per posteriorment anar-los extraient en funció del seu temps de cultiu, els cultius que se sembraven dijous eren extrets, dissabte (48 h), diumenge (72 h i 72 h Cyt-B) i dilluns següent (96 h apc), mentre que els cultius que se sembraven dissabte eren extrets dilluns (48 h), dimarts (72 h i 72 h Cyt-B) i dimecres (96 h apc).

Taula 6. Organigrama de la recollida de les mostres i del seu processament

		DILLUNS	DIMARTS	DIMECRES	DIJOUS	DIVENDRES	DISSABTE	DIUMENGE
CICLE 1	UNITAT MÒBIL	Recollida mostres	Recollida mostres	Enviament mostres				
	UAB	Extracció cultius			Sembra de cultius		Extracció cultius	Extracció cultius
		96 h apc			48 h 72 h 72 h Cyt-B 96 h apc		48 h	72 h 72 h Cyt-B Afegir apc
CICLE 2	UNITAT MÒBIL			Recollida mostres	Recollida mostres	Enviament mostres		
	UAB	Extracció cultius	Extracció cultius	Extracció cultius			Sembra de cultius	
		48 h	72 h 72 h Cyt-B Afegir apc	96 h apc			48 h 72 h 72 h Cyt-B 96 h apc	

apc: afidicolina, Cyt-B: citocalasina B

3.1. Cultius de limfòcits de 48 hores

A la Figura 14 es mostra l'esquema del processament de les mostres.

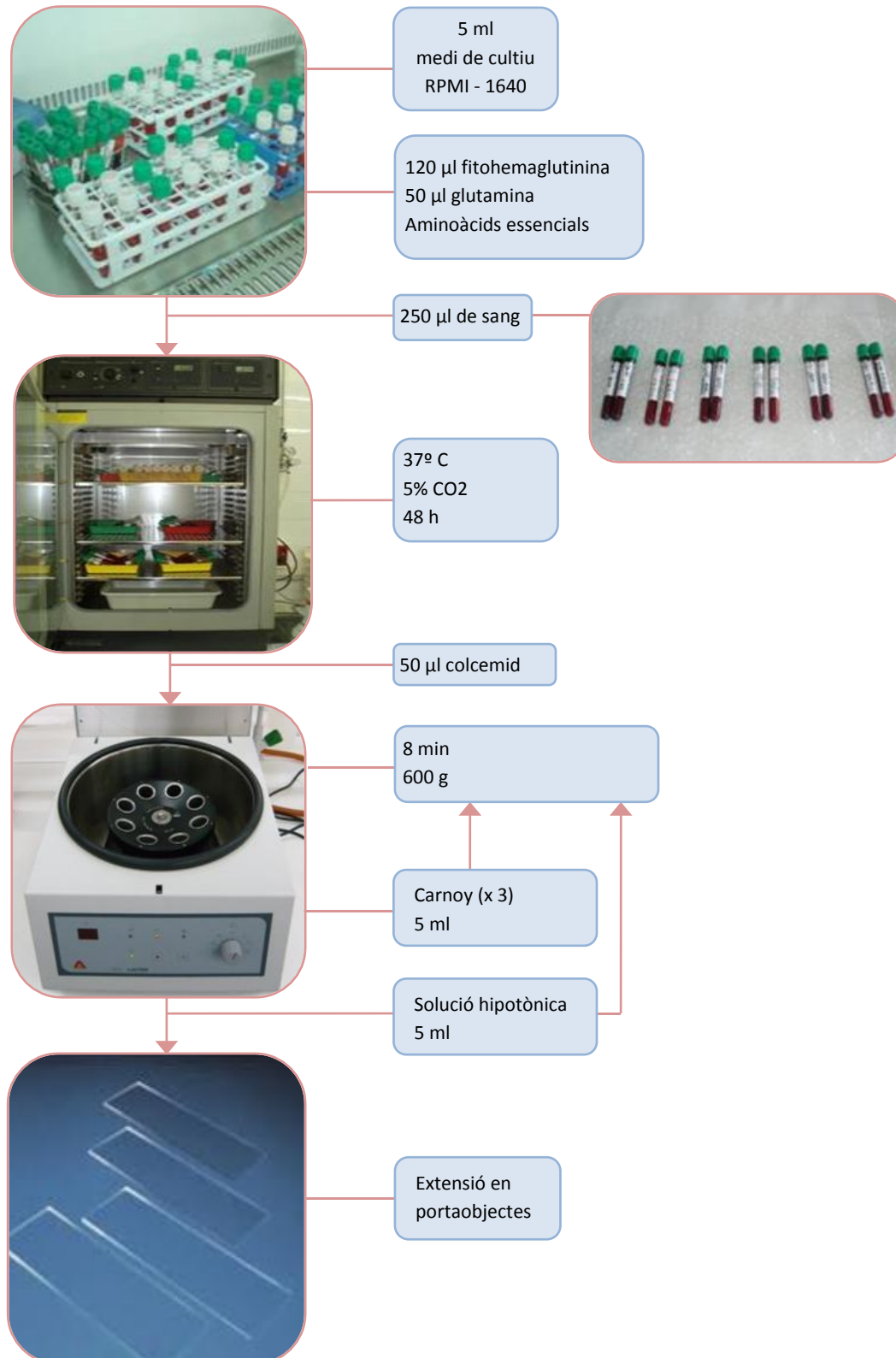


Figura 14: Esquema del processament de les mostres.

Preparació i conservació del medi de cultiu

Al medi base de cultiu RPMI-1640 s'afegeixen: 20% de sèrum boví fetal (FCS) que conté factors essencials per al creixement cel·lular, prèviament inactivat mitjançant calor (57° C durant 30 min); 1% de penicilina-estreptomicina (10 U/ml), antibiòtics per evitar contaminacions i 25 mM de Hepes.

A continuació es distribueix el medi de cultiu en alíquotes de 5ml en tubs cònics i es guarden al congelador a -20° C fins el moment de la seva utilització. Es descongela i s'afegeixen 120 µl de fitohemaglutinina (10 µg/ml), un mitògen que estimula la proliferació cel·lular dels limfòcits T, també s'afegeixen 50 µl de glutamina (Gibson) i aminoàcids essencials per a la viabilitat cel·lular.

Sembra i incubació del cultiu

Per a fer el cultiu s'afegeixen 250 µl de sang en cada tub de 5ml de cultiu, es posen a incubar a 37° C en una estufa al 5% de CO₂ durant 48 h, i es procedeix a l'agitació suau dels tubs dos cops al dia durant tot el temps d'incubació. A les 47 h 30 min de cultiu s'afegeixen 50 µl de colcemid (0,1 ng/ml), per bloquejar les cèl·lules a l'estadi de metafase, ja que impedeix la despolimerització dels microtúbuls que formen el fus mitòtic.

Extracció del cultiu

En primer lloc, es centrifuga 8 min a 600 g, es retira el sobrenedant i s'afegeixen 5 ml de solució hipotònica de clorur potàssic (0,075 M) a 37°C de forma lenta, però continuada. Es deixa que actuï durant 15 min a 37° C, amb l'objectiu de sotmetre les cèl·lules a un xoc hipotònic i que s'unflin per osmosi.

Es torna a centrifugar, es retira el sobrenedant i s'afegeixen 5 ml del fixador Carnoy (3:1 metanol:àcid acètic), també de forma lenta però continuada. La funció del metanol serà fer precipitar la cromatina, mentre que l'àcid acètic trenca les membranes i les estructures cel·lulars per tal d'obtenir unes extensions el més netes possibles. Aquest pas es repeteix tants cops com faci falta fins que el sobrenedant sigui transparent, moment en que l'hemoglobina haurà estat totalment eliminada.

Obtenció d'extensions cromosòmiques

A continuació es procedeix a fer les extensions sobre els portaobjectes, prèviament desengreixats en metanol al 100% a -20° C. Després de tornar a centrifugar, es treu el sobrenedant, es resuspèn el botó cel·lular en una mica de Carnoy (3-8 gotes) amb una proporció 3:2, i amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur es deixen caure 2 o 3 gotes sobre el portaobjectes en una atmosfera humida. A continuació, s'afegeixen unes gotes del fixador directament sobre el portaobjectes perquè la humitat faciliti l'extensió de la suspensió cel·lular i els cromosomes quedin separats i sense solapaments. Es deixa assecar a l'aire.

3.2. Cultius de limfòcits amb addició d'afidicolina

Preparació de la solució d'afidicolina

Es resuspèn l'afidicolina en dimetil sulfòxid (DMSO) per obtenir una concentració final de 2 mM (1 mg d'afidicolina liofilitzada en 1.450 μ l de DMSO). A continuació es resuspenen 10 μ l d'aquesta solució (2 mM) en 990 μ l de medi de cultiu, i s'obté una concentració final de 0,2 μ M d'afidicolina.

S'aliquota la solució d'afidicolina (0,2 μ M) en tubs d'1,5 ml estèrils que són emmagatzemats a -20° C fins a la seva utilització.

Addició d'afidicolina

Es procedeix a fer cultius de limfòcits afegint 250 μ l de sang en un tub cònic amb 5 ml de medi RPMI-1640 complementat, al igual que en el cas anterior de cultius estàndards. Transcorregudes 72 h de cultiu s'afegeixen 0,5 μ l d'afidicolina (0,2 μ M), deixant-la actuar 24 h. S'afegeix Colcemid (0,1 ng/ml) 30 min abans de l'extracció per aturar les cèl·lules a l'estadi de metafase. El temps total de la incubació en estufa a 37° C i 5% de CO_2 és de 96 h. La resta del procediment d'extracció del cultiu i d'obtenció de preparacions cromosòmiques és igual que per als cultius estàndard de 48 h (Fig. 15).

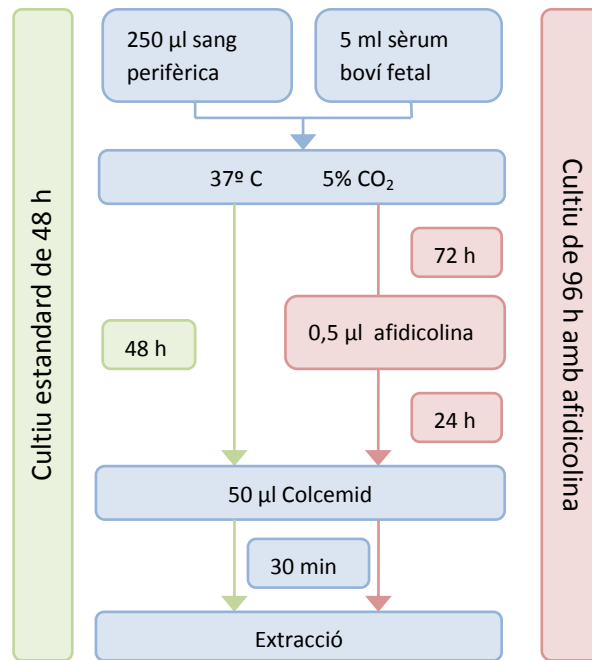


Figura 15. Protocols de cultiu de 48 h i cultiu amb afidicolina.

4. Tinció seqüencial uniforme - bandes G

La tinció uniforme permet conèixer el nombre de cromosomes, grandària, morfologia, posició del centròmer i constriccions secundàries. Amb aquesta tècnica es visualitzen lesions cromosòmiques (de cromosoma i de cromàtide), així com algunes alteracions cromosòmiques com anells, fragments acèntrics, cromosomes dicèntrics, etc.

Per identificar les alteracions estructurals i numèriques, i localitzar les bandes afectades pels trencaments, es realitzà el bandeig cromosòmic mitjançant la tinció amb colorant Wright.

Els protocols emprats són els habituals emprats en el nostre laboratori.

Tinció uniforme amb colorant Leishman

Per obtenir la tinció uniforme s'afegeixen sobre les extensions uns 5ml de solució de colorant Leishman (1:4 Leishman i tampó Leishman) i es deixa que actuï durant 6 min. Després es renta amb aigua per tal d'eliminar les restes de colorant i es deixa assecar a l'aire.

Tractament pre-bandeig: Envelliment

El següent pas és envellir les extensions durant tota la nit a l'estufa a 65° C, seguidament es destenyeixen per treure la tinció uniforme, submergint-los en solució salina 2xSSC (citrat trisòdic dissolt en NaCl 0,3 M) i deixant-ho entre 1 i 3 min. A continuació, es renta la preparació amb aigua i es deixa assecar.

Bandeig cromosòmic mitjançant colorant Wright: Bandes G

Un cop envellides i seques les preparacions, es realitza el bandeig cromosòmic amb colorant Wright al 0,25% (2,5 g de colorant dissolt en 1000ml de metanol en agitador magnètic durant 45 min, filtrat i envellit 3 dies a 37° C) i tampó Sørensen (barreja de solució A: KH₂PO₄, 9,08 g/l i solució B: Na₂HPO₄, 12,88 g/l en una proporció 1:1 ajustada a pH 6,8).

En primer lloc es prepara la solució Wright (1:3 colorant Wright: tampó Sørensen), s'afegeixen sobre les preparacions uns 5 ml de la solució, i es deixa actuar entre 1 - 3 minuts. El temps de tinció s'estableix en funció de les característiques de les mostres, fonamentalment en funció de la quantitat de citoplasma. Finalment, les extensions es renten amb aigua per eliminar l'excés de colorant i es deixen assecar a l'aire.

A continuació es comprova al microscopi òptic la qualitat de les bandes, i si aquesta no és bona, es repeteix tot el procediment de destenyir i tenyir, augmentant el temps d'actuació del colorant Wright. Les preparacions bandejades poden guardar-se indefinidament a 4° C.

5. Anàlisi citogenètica

En aquest estudi, per la detecció de lesions i alteracions cromosòmiques, s'ha emprat un microscopi òptic Nikon Eclipse 90i dotat amb una càmera *charge-coupled device* (CCD) d'alta sensibilitat (Nikon) que està acoblada a un ordinador equipat amb el programa de captura i anàlisi d'imatges Metasystem amb un software específic per capturar i cariotipar en camp clar (Ikaros).

L'anàlisi citogenètica s'ha realitzat sempre, com a mínim, per dues observadores.

Lesions cromosòmiques

Per a l'estudi de gaps i trencaments s'han analitzat, amb tinció uniforme, un mínim de 100 metafases per individu. Només s'han tingut en compte les metafases de bona qualitat, amb els cromosomes ben estesos, el mínim de superposicions, una bona morfologia i sense restes de citoplasma. Les metafases que presentaven lesions cromosòmiques eren identificades mitjançant les coordenades del microscopi i les imatges corresponents eren capturades (Fig. 16). Després de realitzar el bandeig cromosòmic es localitzaven de nou aquestes metafases i es tornaven a capturar les imatges per poder identificar la banda exacta on es localitzaven les lesions.

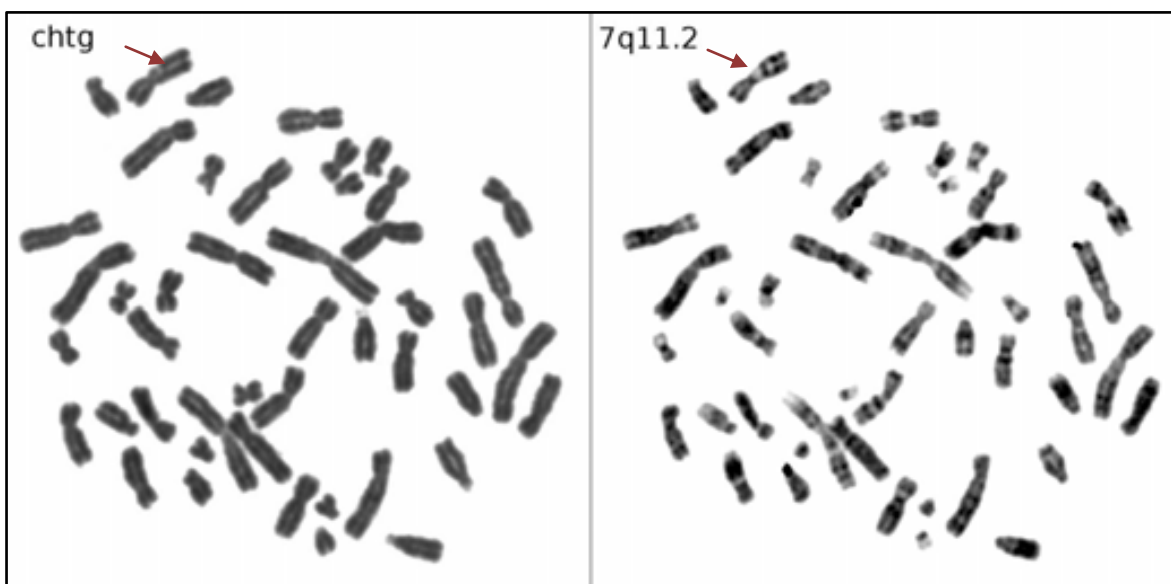


Figura 16. Metafases tractades amb tinció seqüencial uniforme (esquerra) i bandes G (dreta). Les fletxes assenyalen el tipus de lesió observada i la banda cromosòmica afectada per la lesió.

Alteracions cromosòmiques

Per a la identificació de les alteracions cromosòmiques es va realitzar el cariotip d'un mínim de 25 metafases amb bandes G per individu, procedint a la captura d'imatges i a la localització de les coordenades de cada una d'elles.

Nomenclatura

Per a la descripció de les lesions i alteracions cromosòmiques s'han emprat els criteris descrits per l'International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2013).

6. Anàlisi estadística

En aquest treball s'han aplicat diferents mètodes estadístics en funció dels paràmetres a avaluar.

Comparació de resultats citogenètics

S'ha aplicat el test de Chi-quadrat (χ^2), amb el programa informàtic Instat 2, per avaluar els resultats citogenètics obtinguts i comparar E vs NE, cultius de 48 h vs cultius de 72 h i Prestige I vs Prestige II. Els resultats de valor $p \leq 0,05$ s'han considerat com estadísticament significatius.

Comparació del dany cromosòmic induït per afidicolina

S'ha aplicat el test χ^2 , amb el programa informàtic Instat 2, per tal d'avaluar els resultats citogenètics obtinguts en els grups E i NE dels corresponents estudis Prestige I i II. Per resultats de valor $p \leq 0,05$ s'ha considerat com estadísticament significatiu.

6.1. Anàlisi dels punts de trencament

Per determinar si hi ha regions del genoma que es veuen especialment afectades per l'exposició al fuel s'han localitzat, en l'idiograma humà, els punts de trencament implicats en lesions o alteracions cromosòmiques.

Cromosomes i braços cromosòmics

Per determinar els cromosomes i braços cromosòmics més afectats s'ha tingut en compte la seva longitud relativa segons les dades del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, versió 36.3 del Map Viewer <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). S'han calculat les freqüències esperades de trencament per a cada cromosoma, a partir del número total de trencaments trobats i de la longitud relativa de cada un dels cromosomes, considerant que la distribució dels punts de trencament fos a l'atzar.

La llargada total del genoma i les llargades relatives de cada cromosoma i de cada braç cromosòmic es troben en la Taula 7.

Els càlculs de freqüències esperades s'han realitzat per separat pels dos grups, E i NE, i s'ha comparat amb les freqüències observades realitzant un test de χ^2 per provar la hipòtesi nul·la d'una distribució uniforme dels punts de trencament entre tots els cromosomes/braços cromosòmics. S'ha aplicat la correcció de Sidak per a múltiples comparacions i només s'han considerat com a estadísticament significatius els valors de p inferiors a 0.05.

Taula 7. Llargada de cada cromosoma i dels braços curt (p) i llarg (q)

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

Bandes cromosòmiques

Per dur a terme l'estudi de les bandes cromosòmiques més afectades, s'han realitzat dues aproximacions diferents:

- Longitud relativa de bandes cromosòmiques segons les dades NCBI (National Center for Biotechnology Information).
- Mètode FSM o multinomial per a l'estudi de llocs fràgils (*Fragile Sites Multinomial method*) (Böhm *et al.*, 1995; Greenbam *et al.*, 1997; de la Chica *et al.*, 2005).

Longitud relativa de bandes

S'ha dut a terme el mateix procediment que en el cas anterior, però aquest cop, calculant els valors esperats de trencaments per a cada una de les bandes cromosòmiques amb una resolució de 400 bandes.

Mètode FSM

El mètode multinomial per a l'estudi de llocs fràgils (FSM, versió 995) és un programa que permet determinar si les diferents bandes cromosòmiques es veuen afectades a l'atzar, o no, sense considerar l'efecte de les diferents mides de les bandes. Aquest mètode està especialment dissenyat per a la identificació de llocs fràgils (Böhm *et al.*, 1995; Greenbaum *et al.*, 1997; de la Chica *et al.*, 2005).

El programa valora si una banda concreta s'ha trencat degut a l'atzar o si presenta una predisposició a patir lesions. El model està dissenyat per cèl·lules tractades amb afidicolina, i això fa que presenti diversos requeriments:

- Cada individu ha de tenir un mínim de 200 lesions per a un nivell de resolució de 400 bandes.
- Tots els individus han de tenir cariotip 46,XX
- Només pot analitzar un màxim de 30 individus.

Com les nostres dades no compleixen aquests requisits, s'ha realitzat un ajustament que consisteix en establir únicament dos individus, un per al grup E i altre per al grup NE. Donat que en el cas de l'estudi de genotoxicitat amb cultius de 48 h, el nombre de trencaments per individu no arriba als 200 necessaris, els resultats que s'obtenen són només una aproximació. Aquesta modificació del mètode ja havia estat prèviament utilitzat pel nostre grup (de la Chica *et al.*, 2005, Monyarch., 2010; Hildur, 2012; Monyarch *et al.*, 2013).

El mètode FSM utilitza el test de χ^2 i el test G^2 per determinar el grau de significança estadística de les bandes alterades, per cada grup per separat i per la suma dels dos grups.

El programa ha estat cedit per la Dra. Greenbaum (ira@bio.tamu.edu) i les anàlisis han estat portades a terme per nosaltres.

Resultats

En aquest treball s'ha realitzat l'estudi genotòxic de 104 pescadors i mariscadors gallecs amb cultius de limfòcits de 48 h. A més, s'ha estudiat, mitjançant cultius tractats amb afidicolina, si la reparació de l'ADN estava afectada, en 44 individus del Prestige I (22E i 22NE) i 18 d'aquests mateixos individus del Prestige II (8E i 10NE).

En l'estudi genotòxic, s'han analitzat 10.785 metafases amb tinció uniforme-bandes G i 2.941 cariotips. En els cultius tractats amb afidicolina s'han estudiat 6.425 metafases.

1. Característiques generals de la població estudiada

Els individus estudiats pertanyen a confraries de diferents localitats gallegues: 9 molt contaminades pel fuel i 10 poc afectades. Les diferents confraries que van participar en aquest estudi es mostren a la Taula 8. En les zones més contaminades només es van seleccionar individus que participaven en la neteja (E) i en les menys contaminades als individus que no van col·laborar en la neteja (NE), per raons diferents a problemes de salut.

Taula 8. Confraries que han participat en el present estudi

Confraries			
Molt exposades	Individus	Poc exposades	Individus
Cabo de Cruz	2	Miño	11
Carnota	3	Pontedeume	6
Corcubión	8	Lorbe	2
Fisterra	11	Barallobre	1
Muxia	4	Espasante	6
Camariñas	20	Mugardos	10
Laxe	1	Cedeira	1
Corme	8	Foz	3
Camelle	1	Celeiro	4
		San Ciprian	2

Un cop finalitzat l'anàlisi citogenètic, es va saber quins dels 104 individus analitzats eren E (58 individus) o NE (46 individus).

A l'estudi van participar més dones (69,2%) que homes (30,8%), no trobant-se cap relació estadísticament significativa entre l'exposició al fuel i el sexe ($p = 0,143$) (Taula 9).

Taula 9. Sexe dels participants en el present estudi

SEXE	Homes		Dones		Total	p
	n	%	n	%	n	
Grup E	21	36,2	37	63,8	58	
Grup NE	11	23,9	35	76,1	46	0,143
Total	32	30,8	72	69,2	104	

Els individus NE són, de mitjana, 2,8 anys més grans que els E, no trobant-se una diferència estadísticament significativa entre edat i exposició al fuel (Taula 10).

Taula 10. Edat dels participants en el present estudi

EDAT	n	Mitjana	Mín	Màx	p
Grup E	58	53,4	33,6	68,5	
Grup NE	46	56,2	35,3	69,2	0,114
Total	104	54,7	33,6	69,2	

Dintre del grup E, quan analitzem conjuntament l'efecte de l'edat, el sexe i l'exposició al fuel, trobem diferències en relació a l'edat d'homes i dones del grup E (Taula 11). Les dones tenen una mitjana d'edat 8,2 anys superior a la dels homes.

Taula 11. Diferències en l'edat i el sexe entre els grups E i NE

	Homes	Dones	p
Grup E	47,35 ± 4,60	57,02 ± 2,49	<0,0001
Grup NE	52,45 ± 7,16	57,43 ± 2,26	0,068
p	0,197	0,803	

2. Anàlisi citogenètica de la població estudiada

En tots els individus estudiats el cariotip ha estat normal (46,XX o 46,XY), excepte en l'individu NE2 amb una del(X)(q22.2) en mosaic, donant com a resultat el següent cariotip: 45,X[26]/46,X,del(X)(q22.2)[52]/46,XX[11]/47,XX,+del(X)(q22.2)[11]. També s'han trobat 4 individus del grup E amb polimorfismes cromosòmics, tal i com es detalla a la Taula 12.

Taula 12. Polimorfismes cromosòmics detectats en el present estudi

Individu	Polimorfisme
E24	46,XX, 1qh+
E25	46,XX, 16hq+
E26	46,XX, 22ps+
E42	46,XX, inv9

Els resultats citogenètics obtinguts per cada un dels individus estudiats dels grups E i NE es detallen en els annexes 1 i 2, respectivament.

2.1. Lesions cromosòmiques

En total han estat analitzades 10.785 metafases amb tinció uniforme. S'han trobat els quatre tipus de lesions en ambdós grups, E i NE (Taula 13, Fig. 17). El nombre total de metafases amb lesions, total de lesions i total de trencaments, són estadísticament majors en el grup NE que en el grup E.

Taula 13. Lesions cromosòmiques detectades en la població estudiada

	Grup E		Grup NE		p
	n	%	n	%	
Total individus	58		46		
Metafases analitzades	6033		4752		
Metafases amb lesions cromosòmiques	69	1,1	82	1,7	0,014
Lesions cromosòmiques	74	1,2	93	2,0	0,005
Gaps	53	0,9	58	1,2	0,145
De cromàtide	46	0,8	45	0,9	0,672
De cromosoma	7	0,1	13	0,3	0,096
Trencaments	21	0,3	35	0,7	0,008
De cromàtide	5	0,1	18	0,4	0,002
De cromosoma	16	0,3	17	0,4	0,491
Tetradials	1		1		

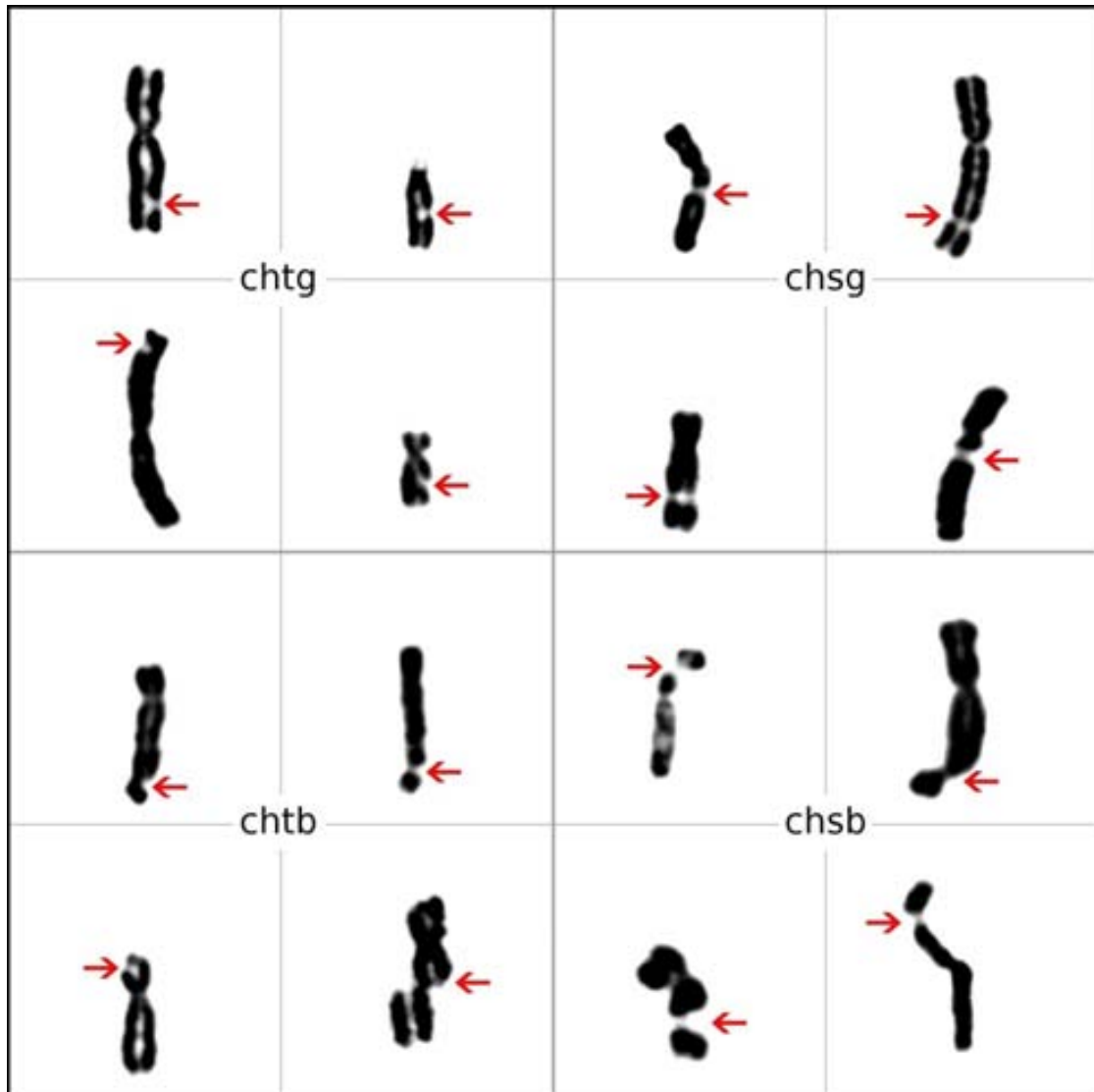


Figura 17. Tipus de lesions cromosòmiques detectades amb tinció uniforme: gaps de cromàtide (chtg), gaps de cromosoma (chsg), trencaments de cromàtide (chtb) i trencaments de cromosoma (chsb).

La tinció seqüencial uniforme-bandes G ha permès identificar el 96,4% (161/167) de totes les bandes cromosòmiques amb lesions (97,3% gaps i 94,6% trencaments).

També s'han observat metafases amb alteracions múltiples (2 en el grup E i 1 en el grup NE) (Fig. 18). Aquestes metafases no s'han tingut en compte per a l'anàlisi estadística.

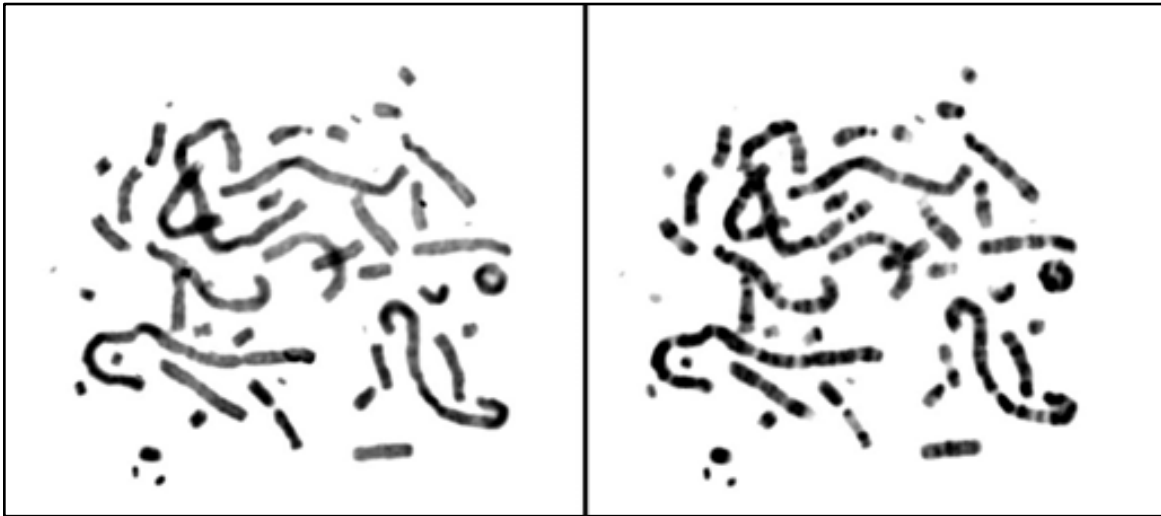


Figura 18. Metafase amb alteracions cromosòmiques múltiples amb tinció seqüencial uniforme (esquerra) - bandes G (dreta).

2.2. Alteracions cromosòmiques estructurals

En l'anàlisi d'alteracions cromosòmiques estructurals s'han cariotipat un mínim de 25 metafases per individu. En total han estat analitzades 2.915 metafases.

La majoria d'alteracions cromosòmiques observades han estat desequilibrades, tan per al grup E com per al NE (Taula 14). Les alteracions estructurals més freqüents han estat, en ordre decreixent: delecions, fragments acèntrics, translocacions desequilibrades i cromosomes marcadors (Fig. 19). No s'han trobat diferències estadísticament significatives entre ambdós grups en relació als diferents tipus d'alteracions estructurals, exceptuant els cromosomes marcadors que en el grup NE presenten un nombre superior respecte als E ($p < 0.001$).

Taula 14. Alteracions cromosòmiques estructurals detectades en la població estudiada

	Grup E		Grup NE		p
	n	%	n	%	
Total individus	58		46		
Metafases cariotipades	1616		1299		
Metafases amb alteracions cromosòmiques estructurals	97	6,0	88	6,8	0,439
Alteracions cromosòmiques estructurals	110	6,8	109	8,4	0,123
Equilibrades	8	0,5	8	0,6	0,852
Translocacions recíproques	5	0,3	7	0,5	0,502
Inversions	3	0,2	1	0,1	0,776
Desequilibrades	102	6,3	101	7,8	0,142
Delecions	41	2,5	27	2,1	0,489
Fragments acèntrics	16	1,0	9	0,7	0,507
Translocacions desequilibrades	16	1,0	18	1,4	0,415
Translocacions dicèntriques	9	0,6	5	0,4	0,691
Translocació tricèntrica	1	0,1	0	0,0	0,370
Cromosomes en anell	4	0,2	7	0,5	0,331
Cromosomes marcadors	14	0,9	35	2,7	0,0002
Isocromosomes	1	0,1	0	0,0	0,370



Figura 19. Cariotips amb diferents alteracions cromosòmiques estructurals. A dalt cariotip 46,XX,del(4q25)+ace i a sota cariotip 45,XY,-12,t(8;11)(q24.1;q13).

2.3. Alteracions cromosòmiques numèriques

No s'han observat diferències estadísticament significatives entre els dos grups E i NE en relació a les anomalies numèriques (Taula 15).

Taula 15. Alteracions cromosòmiques numèriques detectades en la població estudiada

	Grup E		Grup NE		p
	n	%	n	%	
Individus	58		46		
Metafases cariotipades	1616		1299		
Metafases amb alteracions cromosòmiques numèriques	245	15,2	214	16,5	0,465
Alteracions cromosòmiques numèriques	277	17,1	250	19,2	0,156
Trisomies	19	1,2	22	1,7	0,307
Monosomies	258	16,0	228	17,6	0,275

En tots dos grups la trisomia de l'X i la del 21 han estat les alteracions cromosòmiques numèriques més freqüents (Taula 16). El gran nombre de monosomies pot haver estat causat, en part, per una pèrdua artefactual de cromosomes durant l'obtenció de les extensions.

Taula 16. Nombre i tipus d'aneuploidia en la població estudiada

	Grup E		Grup NE	
	Trisomia	Monosomia	Trisomia	Monosomia
Chr 1	0	1	0	0
Chr 2	0	2	1	2
Chr 3	1	6	1	3
Chr 4	0	8	1	3
Chr 5	0	5	0	4
Chr 6	0	2	0	4
Chr 7	0	3	0	8
Chr 8	0	7	1	5
Chr 9	2	8	4	3
Chr 10	0	7	0	6
Chr 11	0	4	0	10
Chr 12	1	12	0	10
Chr 13	0	9	0	9
Chr 14	0	7	0	11
Chr 15	0	6	0	5
Chr 16	0	9	0	7
Chr 17	0	8	0	8
Chr 18	0	8	1	9
Chr 19	0	25	0	19
Chr 20	0	13	0	11
Chr 21	6	21	3	20
Chr 22	2	41	2	26
Chr X	6	46	7	45
Chr Y	1	0	1	0
Total trisomies	19		22	
Total monosomies		258		228
Total numèriques		277		250

2.4. Cromosomes, braços i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel

Per determinar si existeixen cromosomes, braços cromosòmics o bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel, s'han identificat els punts de trencament implicats en lesions i alteracions estructurals.

Per identificar els cromosomes i braços cromosòmics més afectats s'ha utilitzat una anàlisi estadística que té en compte la longitud relativa de cada cromosoma. Si considerem que la distribució dels punts de trencament és deguda a l'atzar, el nombre de trencaments esperats d'un cromosoma concret serà proporcional a la seva mida. Els trencaments esperats els comparem amb els trencaments observats, i així obtenim els cromosomes i braços cromosòmics que s'han vist més afectats.

En total, dels 184 punts de trencament observats en el grup E, s'han pogut localitzar en l'idiograma 146 (79,3%) (69 lesions cromosòmiques i 77 alteracions cromosòmiques estructurals). En el cas del grup NE, dels 202 punts de trencament, s'han pogut localitzar 157 (77,7%) (91 lesions i 66 alteracions cromosòmiques estructurals).

Els punts de trencament no es distribueixen de manera uniforme, sinó que es localitzen amb major freqüència en determinats cromosomes, independentment de la seva mida (Fig. 20). En el grup E, el cromosoma més afectat ha estat el 17 (11 trencaments observats respecte a 4 esperats per la seva mida) ($p=0,003$), mentre que en el grup NE no s'ha trobat cap cromosoma més afectat.

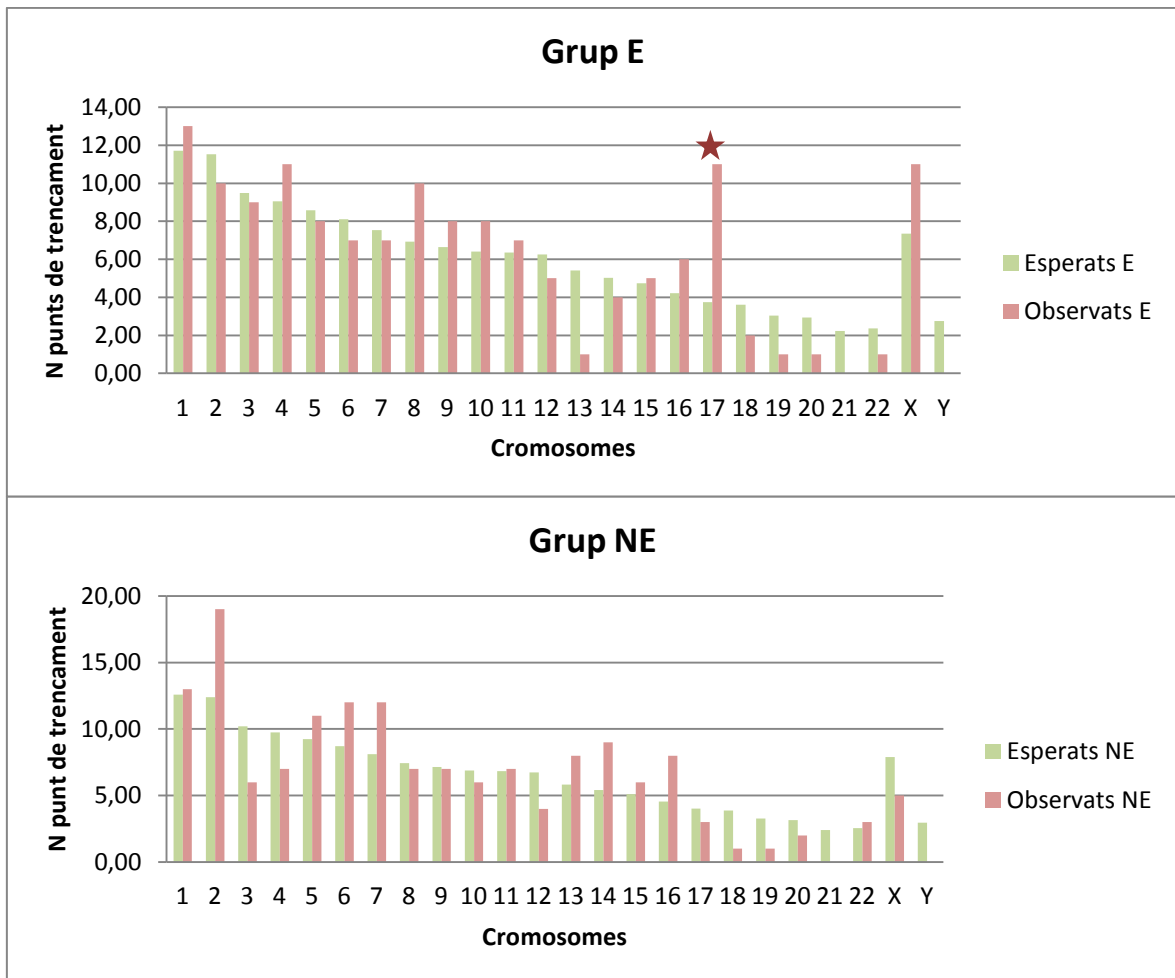


Figura 20: Distribució dels punts de trencament esperats i observats en els diferents cromosomes en la població estudiada. L'estel indica les diferències estadísticament significatives entre els valors esperats i observats.

Els braços cromosòmics més afectats en el grup E han estat el 8p ($p=0,01$) i el 17q ($p=0,001$). En el grup NE no s'ha trobat cap braç cromosòmic afectat de manera significativa (Fig. 21).

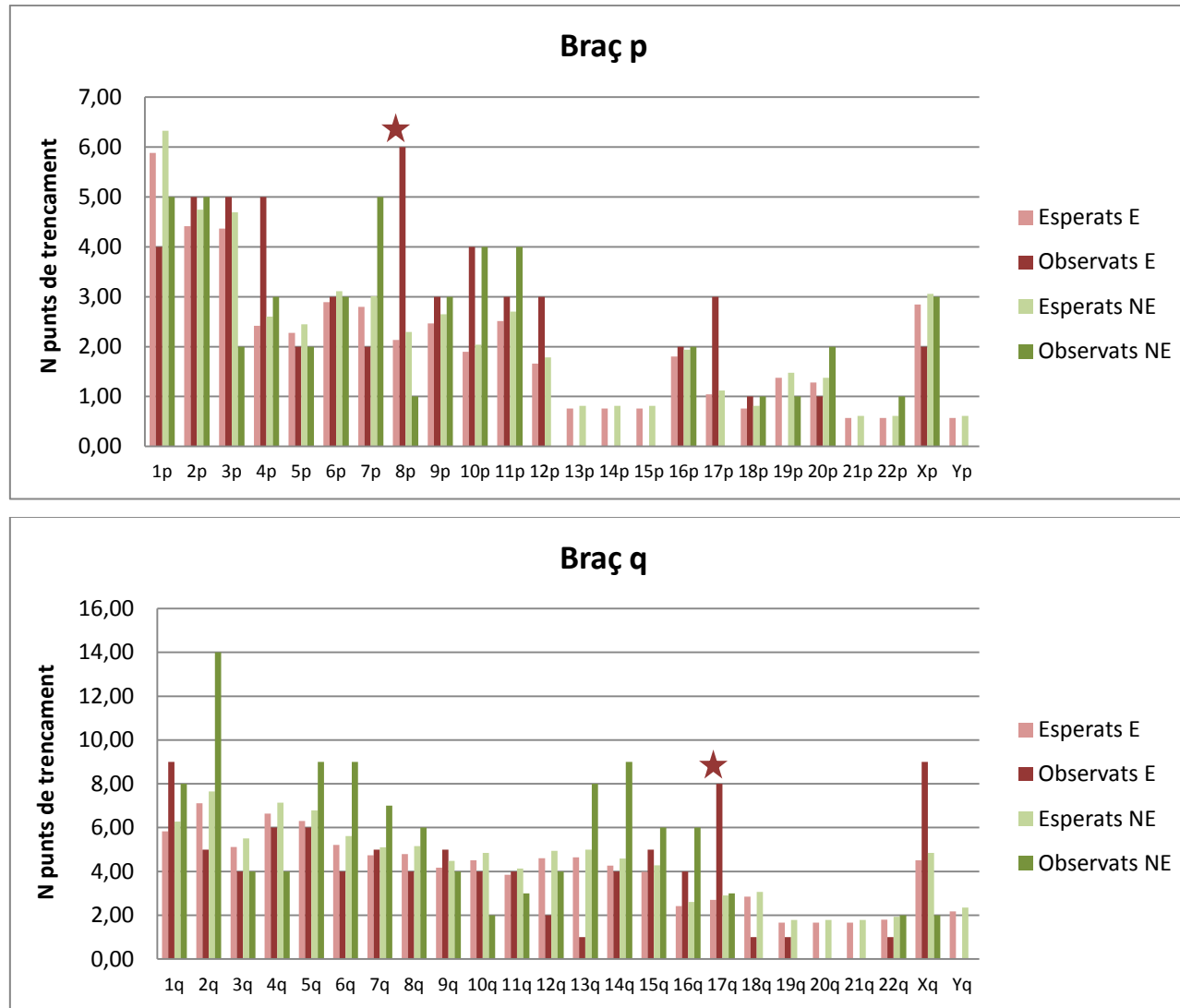


Figura 21: Distribució dels punts de trencament esperats i observats en els braços p i q en la població estudiada. L'estel indica les diferències estadísticament significatives entre els valors esperats i observats.

2.4.1. Bandes cromosòmiques

La distribució dels punts de trencament en l'idiograma (400 bandes de resolució) afecta a 114 bandes cromosòmiques en el grup NE i 120 en el grup E (Fig. 22).

Segons el mètode FSM, les bandes amb més de tres trencaments es consideren estadísticament significatives, aquestes són: 8p23 (4 trencaments) i 17q21 (6 trencaments) en el grup E i 5q31 (4 trencaments) i 7p15 (4 trencaments) en el grup NE.



Figura 22. Idiograma humà (400 bandes de resolució) on es mostren les bandes cromosòmiques implicades en lesions i alteracions cromosòmiques estructurals en la població estudiada. A l'esquerra, en verd, els punts de trencament implicats en els NE, i a la dreta, en vermell, els punts implicats en E.

L'anàlisi estadística que té en compte la longitud relativa de cada banda cromosòmica ha mostrat 7 bandes amb un nombre de trencaments estadísticament superior en el grup E: 6p21.2, 8p23, 9q13, 10p14, 16q13, 17p12 i 17q21 i 8 bandes en el grup NE: 5q31, 7p15, 8q24.1, 9q13, 10p13, 12q22, 15q15 i 16q13.

Si comparem els resultats obtinguts mitjançant els dos mètodes estadístics, observem que només hi ha dues bandes que coincideixen: 8p23 i 17q21 (grup E) i 5q31 i 7p15 (NE) (Taula 17).

Taula 17. Cromosomes, braços cromosòmics i bandes més afectades en la població estudiada

	Grup E	Grup NE
Cromosomes + afectats	17	
Braç cromosòmic		
Curt	8p	
Llarg	17q	
Bandes cromosòmiques		
Mètode estadístic		
FSM	8p23, 17q21	5q31, 7p15
Longitud relativa de bandes	6p21.2, 8p23 , 9q13, 10p14, 16q13, 17p12, 17q21	5q31, 7p15 , 8q24.1, 9q13, 10p13, 12q22, 15q15, 16q13

3. Comparació de les dades citogenètiques del Prestige I i Prestige II

En aquest apartat es comparen els resultats obtinguts en el Prestige II (cultius de 48 h i 72 h) i en el Prestige I (cultius de 72 h). Les comparacions s'han realitzat sempre 2 a 2:

- Prestige II (48 h) vs Prestige II (72 h) (Annexes 3 i 4)
- Prestige I (72 h) vs Prestige II (72 h) (Annexes 5 i 6)

L'estudi comparatiu s'ha portat a terme només en aquells individus estudiats en els tres treballs. Dels 104 individus estudiats en aquest treball, només 69 (47 E i 22 NE) van ser estudiats prèviament en el Prestige I (Monyarch, 2010) i el Prestige II (Hildur, 2012).

3.1. Lesions cromosòmiques

En la Taula 18 es mostra la comparació de les lesions cromosòmiques detectades en els estudis del Prestige I (72 h) i Prestige II (48 h i 72 h). El percentatge de trencaments és similar en els tres estudis. Els individus E presenten una disminució del nombre de lesions ($p=0.0004$) a Prestige II (48 h) respecte al Prestige II (72 h). Per altra banda, els individus E presenten un augment de lesions ($p=0.0001$) a Prestige II (72 h) respecte a Prestige I (72 h) que són atribuïbles als gaps. En cap dels estudis s'han trobat diferències en el nombre de lesions entre els grups E i NE.

Els individus NE presenten percentatges similars de lesions en els tres estudis.

Taula 18. Comparació de les lesions cromosòmiques detectades en els estudis del Prestige I (72 h), Prestige II (72 h) i Prestige II (48 h) en els mateixos individus

	Grup E						Grup NE					
	Prestige I 72 h		Prestige II 72 h		Prestige II 48 h		Prestige I 72 h		Prestige II 72 h		Prestige II 48 h	
Individus	47		47		47		22		22		22	
Metafases analitzades	4874		4829		4905		2338		2265		2280	
Metafases amb lesions cromosòmiques	32	0,7%	94 ^a	1,9%	54 ^b	1,1%	23	1,0%	36	1,6%	31	1,4%
Lesions cromosòmiques	37	0,8%	101^a	2,1%	57^b	1,2%	25	1,1%	38	1,7%	35	1,5%
Gaps	17	0,3%	74^a	1,5%	42^b	0,9%	12	0,5%	32^c	1,4%	24	1,1%
De cromàtide	11	0,2%	52 ^a	1,1%	35	0,7%	9	0,4%	23 ^c	1,0%	23	1,0%
De cromosoma	6	0,1%	22 ^a	0,5%	7 ^b	0,1%	3	0,1%	9	0,4%	1 ^d	0,0%
Breaks	20	0,4%	27	0,6%	15	0,3%	13	0,6%	6	0,3%	11	0,5%
De cromàtide	6	0,1%	3	0,1%	5	0,1%	7	0,3%	3	0,1%	6	0,3%
De cromosoma	14	0,3%	24	0,5%	10 ^b	0,2%	6	0,3%	3	0,1%	5	0,2%
Tetrrarradial	1	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

^aaugment en E Prestige II 72 h respecte a E Prestige I 72 h ($p < 0,005$); ^bdisminució en E Prestige II 48 h respecte a E Prestige II 72 h ($p < 0,05$);

^caugment en NE Prestige II 72 h respecte a NE Prestige I 72 h ($p < 0,05$); ^ddisminució en NE Prestige II 48 h respecte a NE Prestige II 72 h ($p < 0,05$)

3.2. Alteracions cromosòmiques estructurals

El nombre i tipus d'alteracions cromosòmiques estructurals detectades en els estudis del Prestige I (72 h) i el Prestige II (48 h i 72 h) es detallen en la Taula 19. El total d'alteracions estructurals equilibrades és similar en els tres estudis, per a tots els grups d'individus analitzats. La majoria d'alteracions estructurals són desequilibrades, sent les més freqüents, cromosomes marcadors i delecions.

Els individus E mostren un percentatge similar d'alteracions estructurals a Prestige I (72 h), Prestige II (72 h) i Prestige II (48 h). Només en el Prestige I (72 h) s'ha detectat un augment del nombre d'alteracions a E vs NE ($p=0.0001$).

En els individus NE s'ha trobat un augment del total d'alteracions cromosòmiques estructurals ($p=0,0021$) en el Prestige II (72 h) respecte al Prestige I (72 h). Aquesta diferència és deguda a l'increment d'alteracions desequilibrades en Prestige II (72 h) ($p=0,0006$).

Taula 19. Comparació de les alteracions cromosòmiques estructurals detectades en els estudis del Prestige I (72 h), Prestige II (72 h) i Prestige II (48 h) en els mateixos individus

	Grup E						Grup NE					
	Prestige I 72 h		Prestige II 72 h		Prestige II 48 h		Prestige I 72 h		Prestige II 72 h		Prestige II 48 h	
Individus	47		47		47		22		22		22	
Metafases cariotipades	1243		1339		1314		597		625		636	
Metafases amb alteracions cromosòmiques estructurals	68	5,5%	71	5,3%	72	5,5%	10	1,7%	28 ^f	4,5%	38	6,0%
Alteracions cromosòmiques estructurals	93^a	7,5%	90	6,7%	81	6,2%	11	1,8%	33^f	5,3%	43	6,8%
Equilibrades	8	0,6%	3	0,2%	6	0,5%	3	0,5%	2	0,3%	2	0,3%
Translocacions recíproques	6	0,5%	3	0,2%	3	0,2%	3	0,5%	1	0,2%	2	0,3%
Translocacions robertsonianes	2	0,2%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Inversions	0	0,0%	0	0,0%	3	0,2%	0	0,0%	1	0,2%	0	0,0%
Desequilibrades	85^a	6,8%	87	6,5%	64	4,9%	8	1,3%	31^f	5,0%	29	4,6%
Cromosomes marcadors	33 ^a	2,7%	26	1,9%	11 ^d	0,8%	3	0,5%	8	1,3%	12	1,9%
Delecions	19 ^a	1,5%	42 ^b	3,1%	26	2,0%	3	0,5%	14 ^f	2,2%	11	1,7%
Fragments acèntrics	12 ^a	1,0%	3 ^c	0,2%	15 ^e	1,1%	0	0,0%	4	0,6%	7	1,1%
Translocacions desequilibrades	9	0,7%	8	0,6%	10	0,8%	1	0,2%	3	0,5%	5	0,8%
Translocacions dicèntriques	6	0,5%	5	0,4%	8	0,6%	1	0,2%	2	0,3%	3	0,5%
Cromosomes en anell	6	0,5%	3	0,2%	3	0,2%	0	0,0%	0	0,0%	3	0,5%
Translocació tricèntrica	0	0,0%	0	0,0%	1	0,1%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Isocromosomes	0	0,0%	0	0,0%	1	0,1%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

^aaugment en E Prestige I 72h respecte a NE Prestige I 72 h ($p < 0,0005$; acés $p = 0,0358$); ^baugment en E Prestige II 72 h respecte a E Prestige I 72 h ($p = 0,011$); ^cdisminució en E Prestige II 72 h respecte a E Prestige I 72 h ($p = 0,027$); ^ddisminució en Prestige II 48 h respecte a E Prestige II 72 h ($p = 0,024$); ^e augment en Prestige II 48 h respecte a E Prestige II 72 h ($p = 0,008$); ^f augment en NE Prestige II 72 h respecte a NE Prestige I 72 h

3.3. Cromosomes, braços i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel

A la Taula 20 es mostren els cromosomes, braços cromosòmics i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel en els tres estudis (Prestige I 72 h i Prestige II 48 h i 72 h).

No s'ha observat cap banda entre les més afectades per l'exposició al fuel, comú als tres estudis. En el grup E d'ambdós estudis del Prestige II han trobat les bandes 9q13 i 17q21 com especialment afectades utilitzant el mètode de longitud relativa de bandes i només la 17q21 emprant els dos mètodes.

Taula 20. Cromosomes, braços cromosòmics i bandes més afectades en els estudis de Prestige I (72 h) i Prestige II (72 h) i Prestige II 48 h)

	Grup E			Grup NE		
	Prestige I 72 h	Prestige II 72 h	Prestige II 48 h	Prestige I 72 h	Prestige II 72 h	Prestige II 48 h
Cromosomes		17	17	1	17	11
Braç cromosòmic						
Curt			8p, 17p			
Llarg		2q, 17q	Xq	1q		
Bandes cromosòmiques						
Mètode estadístic						
FSM	2q21, 18q11.2	14q24, 17q21	8p23, 17q21			10p13, 11q13, 17q21
Longitud relativa de bandes	1q11, 2q21, 4q33, 8p22, 12q11, 18q11.2, 18q23, Xp11.3, Xq24	1q22, 2q21, 2q34, 6q21, 7p15, 8q21.2, 9q13 , 9q22, 14q24, 17p11.2, 17q21	6p21.2, 7q32, 8p23, 9q13 , 16q13, 17p11.2, 17q21	1p34.3, 1q21, 4q33 , 6q26, 7q36, 12q22	2p14, 2q34, 3p21, 4q33 , 10q22, 17p11.2	1p13, 2q11.2, 3q13.2, 4q31.1, 9p13, 10p13, 11p11, 11p14, 11q13, 16q13, 17q21

En vermell les bandes comuns més afectades en E, en blau les bandes comuns més afectades en NE

4. Errors en la reparació de l'ADN: Cultius amb afidicolina

S'ha realitzat l'estudi citogenètic mitjançant tinció uniforme, a partir de limfòcits tractats amb afidicolina, en 44 individus del Prestige I (22E i 22NE) i 18 d'aquests individus (8 E i 10 NE) en Prestige II. En aquest tipus d'estudi només es té en compte l'anàlisi de les lesions cromosòmiques. No obstant, en l'annex 7 es recullen les alteracions cromosòmiques estructurals detectades al llarg de l'estudi amb tinció uniforme.

A la Taula 21 es mostren les lesions cromosòmiques en ambdós estudis. En el Prestige I tots els paràmetres estudiats són majors en E que en el NE ($p < 0,0001$). Quatre anys després (Prestige II), les lesions cromosòmiques, els gaps i els trencaments han estat superiors en el grup E respecte a NE ($p = 0,0001$, $p = 0,0008$ i $p = 0,0421$ respectivament). Al comparar les dades obtingudes en el Prestige I i el Prestige II, s'observa una disminució del nombre de lesions cromosòmiques (i dels diferents subtipus) a Prestige II respecte a Prestige I, tan en el grup E com en el grup NE ($p < 0,0001$).

Taula 21. Lesions cromosòmiques detectades en cultius tractats amb afidicolina en els mateixos individus analitzats a Prestige I i Prestige II

	Grup E				Grup NE			
	Prestige I		Prestige II		Prestige I		Prestige II	
Total individus	22		8		22		10	
Metafases analitzades	2283		840		2252		1050	
Metafases amb lesions cromosòmiques	1195 ^a	52,3%	218 ^{b,c}	26,0%	948	42,1%	182 ^d	17,3%
Lesions cromosòmiques	2295 ^a	101%	337 ^{b,c}	40,1%	1750	77,7%	319 ^d	30,4%
Gaps	1243^a	54,4%	236^{b,c}	28,1%	896	39,8%	224^d	21,3%
De cromàtide	669 ^a	29,3%	153 ^{b,c}	18,2%	485	21,5%	135 ^d	12,9%
De cromosoma	574 ^a	25,1%	83 ^c	9,9%	411	18,3%	89 ^d	8,5%
Trencaments	1052^a	46,1%	101^{b,c}	12,0%	854	37,9%	95^d	9,0%
De cromàtide	382 ^a	16,7%	78 ^c	9,3%	276	12,3%	80 ^d	7,6%
De cromosoma	670 ^a	29,3%	23 ^c	2,7%	578	25,7%	15 ^d	1,4%
Tetradials	2	0,1%	0	0,0%	2	0,1%	0	0,0%

^aaugment en E Prestige I respecte a NE Prestige I ($p < 0,0001$); ^baugment en E Prestige II respecte a NE Prestige II ($p < 0,05$); ^cdisminució en E Prestige II respecte a E Prestige I ($p < 0,0001$); ^ddisminució en NE Prestige II respecte a NE Prestige I ($p < 0,0001$)

4.1. Cromosomes, braços i bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició al fuel

Dels 1813 punts de trencament observats, en els cultius tractats amb afidicolina, s'han identificat 1082 (59,7%) punts implicats en lesions i alteracions cromosòmiques, amb la tècnica seqüencial uniforme-bandes G: 725 corresponen al Prestige I (334 E i 391 NE) i 357 al Prestige II (196 E i 161 NE).

Els cromosomes 3 i 16 i els braços cromosòmics 3p i 16q han estat els més afectats, en cultius tractats amb afidicolina, en E i NE (Taula 22).

Taula 22. Cromosomes i braços cromosòmics més afectats detectats en cultius amb afidicolina a Prestige I i Prestige II

	PRESTIGE I		PRESTIGE II	
	E	NE	E	NE
Cromosomes	3, 16	3, 6, 16	3, 16, 17	3, 6, 16
Braços curts	3p, Xp	3p, Xp	3p	3p
Braços llargs	6q, 7q, 16q	6q, 16q	16q, 17q	6q, 16q, 17q

Bandes cromosòmiques

En utilitzar els dos mètodes estadístics descrits en l'apartat 6.1 de Materials i mètodes (longitud relativa de bandes i FSM), les bandes que s'han trobat més afectades en el grup E, han estat la 3p14, 6q26, 11q13, 16q23 i Xp22.2, tan en el Prestige I com en el Prestige II (Taula 23).

Taula 23. Bandes cromosòmiques més afectades detectades en cultius tractats amb afidicolina a Prestige I i Prestige II

Mètode estadístic	PRESTIGE I		PRESTIGE II	
	E	NE	E	NE
Longitud de bandes	2p23, 3p14, 6q26, 7q22, 7q32, 10q22, 11q13, 16q23, Xp22.2	2p23, 2p15, 2q31, 2q33, 3p23, 3p14, 6q26, 7q32, 11p13, 16q23, 17q21, Xp22.2	2p23, 2q32, 3p14, 6p21.2, 6q21, 6q26, 7q32, 11q13, 16q23, 17q21, Xp22.2	3p14, 6p21.3, 6q26, 7q32, 16q23, 17q21, Xp22.2
FSM	3p14, 6q26, 7q22, 7q32, 10q22, 11q13, 16q23, Xp22.2	2p23, 2q31, 2q33, 3p14, 6q26, 7q32, 11p13, 16q23, 17q21, Xp22.2	2p23, 2q32, 3p14, 6q26, 11q13, 16q23, 17q21, Xp22.2	3p14, 6q26, 11q13, 16q23, 17q21, Xp22.2

En blau les més afectades en tots els grups, en vermell les més afectades per cada grup segons els dos mètodes estadístics

Discussió

1. Característiques del present estudi genotòxic

L'objectiu de qualsevol estudi de seguiment és mesurar la causalitat entre un o més factors de risc i l'anomalia concreta que s'estudia. En el nostre cas, a Prestige I, es va detectar que els individus E presentaven un major nombre d'alteracions cromosòmiques estructurals que els NE dos anys després de l'exposició al fuel (Rodríguez-Trigo *et al.*, 2010; Monyarch, 2010). La presència d'aquestes alteracions cromosòmiques suggeria que: i) alguns dels compostos derivats del fuel poden romandre en el cos, durant anys, generant lesions de manera continuada, ii) les cèl·lules mare de la medul·la òssia es van veure afectades, produint limfòcits amb alteracions, la qual cosa aniria associada a una major predisposició a desenvolupar neoplàsies hematològiques. Degut a l'interès, tan científic com social, d'aquests resultats, les autoritats sanitàries del FIS sol·licitaren al Grup SEPAR-Prestige dur a terme un estudi de seguiment per saber si les alteracions cromosòmiques augmentaven, persistien o desapareixien en augmentar el temps des de l'exposició.

Fins al moment, hi ha molts pocs estudis publicats sobre els efectes genotòxics de l'exposició aguda al fuel, i tots ells analitzen els efectes produïts en el mateix moment de l'exposició, quan els individus encara es troben realitzant les tasques de neteja o poc després. El temps de recollida de mostres oscil·la entre els 10 dies i els 11 mesos després del vessament (Clare *et al.*, 1984; Cole *et al.*, 1997; Laffon *et al.*, 2006b; Pérez-Cadahía *et al.*, 2007; Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a; Pérez-Cadahía *et al.*, 2008b). Només s'ha publicat un estudi on el temps màxim transcorregut des de l'exposició i l'obtenció de les mostres va ser d'un any (Cole *et al.*, 1997). No obstant això, aquests autors no analitzaven els mateixos individus, per tant, no es tracta d'un veritable estudi de seguiment. Els estudis genotòxics del Prestige I i el Prestige II són els únics realitzats en els mateixos individus i analitzant idèntics biomarcadors, per determinar els possibles efectes a mig i llarg termini (2 i 6 anys després de l'exposició).

En aquest treball s'han portat a terme cultius de limfòcits de 48 h per tal de determinar si l'increment de dany cromosòmic s'havia infravalorat amb els cultius de 72 h realitzats prèviament en el nostre grup (Monyarch, 2010; Hildur, 2012). Paral·lelament s'ha analitzat si el dany cromosòmic detectat en el Prestige I i Prestige II es degut a errors en la reparació de l'ADN mitjançant cultius de limfòcits tractats amb afidicolina.

1.1. Criteris estrictes en la selecció d'individus

Un dels objectius del projecte SEPAR-Prestige va ser seleccionar dos grups d'individus (E i NE) el més diferenciats que fos possible, molt exposats i molt poc exposats al fuel, per tal d'aconseguir una distinció més clara respecte a l'exposició i minimitzar una possible exposició ambiental al fuel. Els individus E, no només havien d'haver participat en les tasques de neteja, sinó que també havien de residir en zones d'alta contaminació, mentre que els NE no havien d'haver participat a les tasques de neteja i a més havien de residir en zones de baixa contaminació. Els dos grups d'individus, E i NE, mantenien característiques poblacionals semblants en quant al lloc de residència, tipus de feina, edat, sexe i hàbits de consum, per tal de homogeneïtzar ambdós grups, de manera que la diferència més clara, entre els dos grups, fos l'exposició directa al fuel durant les tasques de neteja. La gran quantitat d'individus que van participar en les tasques de neteja del fuel (uns 300.000) va fer possible aplicar criteris molt estrictes de selecció (Zock *et al.*, 2007). El grau de participació ha sigut un dels més elevats descrits en estudis epidemiològic: 76% en l'estudi inicial (Prestige I) (Zock *et al.*, 2007) i 88% en l'estudi de seguiment (Prestige II) (Zock *et al.*, 2012). S'ha de destacar l'altruisme de tots els participants de l'estudi, ja que no varen rebre cap mena de compensació econòmica.

Per a l'estudi genotòxic, a més, es van descartar els individus fumadors, ja que s'ha descrit una clara relació entre el consum de tabac i l'augment d'alteracions cromosòmiques, adductes d'ADN i intercanvis de cromàtides germanes (Littlefield i Joiner, 1986; Hecht, 1999, Tawn i Whitehouse, 2001; de la Chica *et al.*, 2005; Ben Salah *et al.*, 2011). També es van eliminar altres factors de confusió, com l'exposició a altres agents genotòxics i patir o haver patit càncer, per intentar garantir que els efectes detectats només poguessin ser deguts a l'exposició al fuel. El nostre estudi (Prestige I i Prestige II) és el primer on s'ha realitzat una selecció tan estricta d'individus. Altres estudis genotòxics sobre vessaments de fuel van incloure els individus fumadors, malgrat que van ajustar els resultats pel consum de tabac (Cole *et al.*, 1997; Laffon *et al.*, 2006b; Pérez-Cadahía *et al.*, 2006, 2007, 2008a i 2008b).

1.2. Lesions i alteracions cromosòmiques estructurals com biomarcadors de genotoxicitat

Els estudis sobre els efectes genotòxics de l'exposició aguda al fuel han utilitzat diferents biomarcadors: adductes d'ADN, SCE, test de MN, assaig cometa i anàlisi d'alteracions cromosòmiques (Clare *et al.*, 1984; Cole *et al.*, 1997; Laffon *et al.*, 2006b; Pérez-Cadahía *et al.*, 2007; Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a; Pérez-Cadahía *et al.*, 2008b; Rodríguez-Trigo *et al.* 2010; Monyarch, 2010; Hildur, 2012).

La utilització d'adductes d'ADN en dos estudis sobre vessaments de fuel de petroliers donen resultats contradictoris. Cole *et al.* (1997) no van trobar cap augment d'adductes a l'ADN com a conseqüència de l'exposició al fuel, mentre que Amat-Bronnert *et al.* (2007) van trobar un augment d'adductes al tractar teixit hepàtic amb un extracte de fuel. A més, donat que aquest biomarcador només s'utilitza quan l'agent genotòxic està present (Albertini *et al.*, 2000), ha estat descartat per als estudis del Prestige I i II.

L'intercanvi de cromàtides germanes ha estat emprat en diversos estudis sobre l'exposició aguda al fuel (Clare *et al.*, 1984; Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a; Pérez-Cadahía *et al.*, 2007). Es va observar una associació entre aquest biomarcador i l'exposició al fuel només en treballadors que utilitzaven màquines de vapor a pressió (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a; Pérez-Cadahía *et al.*, 2007). Malgrat que l'SCE es considera sensible a baixes dosis d'exposició, en els darrers anys ha disminuït la seva utilització ja que, a diferència de les alteracions cromosòmiques, el seu augment no s'associa a un major risc de patir càncer (Bonassi *et al.*, 2004; Suspiro i Prista, 2011).

El test de MN ha estat utilitzat àmpliament en estudis genotòxics sobre l'exposició al fuel del Prestige per l'equip de Blanca Laffon, detectant un increment d'aquest biomarcador en els treballadors manuals molt exposats (Pérez-Cadahía *et al.*, 2008b), però no en individus que van participar en altres tasques de neteja (Laffon *et al.*, 2006; Pérez-Cadahía *et al.*, 2008a). En l'estudi genotòxic realitzat pel nostre equip, dos anys després de l'exposició (Prestige I), utilitzant aquest mateix test, no es van trobar diferències entre E i NE (Biern, 2010). Aquests resultats semblen indicar que els MN no són un bon biomarcador quan l'agent ja no està present i per tant, es va descartar per a l'estudi de seguiment.

L'assaig cometa es considera molt bon biomarcador amb una elevada sensibilitat en la detecció de danys recents en l'ADN. S'ha observat una associació entre l'increment d'aquest biomarcador i l'exposició aguda al fuel del Prestige (Laffon *et al.*, 2006b; Pérez-

Cadahía *et al.*, 2008a i 2008c). No obstant, aquest dany es pot reparar fàcilment (Suspiro i Prista, 2011), limitant la seva utilització en estudis de seguiment.

L'únic treball on s'analitza l'efecte de l'exposició aguda al fuel, utilitzant com biomarcador les alteracions cromosòmiques, Clare *et al.* (1984) no detectà cap increment associat a l'exposició al fuel. Malgrat aquests resultats, les alteracions cromosòmiques s'han emprat com a biomarcador de genotoxicitat des de fa més de 30 anys, considerant-se un dels biomarcadors més informatius (Albertini *et al.*, 2000; Norppa, 2004). La associació entre alteracions cromosòmiques estructurals i l'exposició aguda al fuel detectada en el Prestige I, dos anys després de l'exposició (Monyarch, 2010), ens va reafirmar en la seva utilització en l'estudi genotòxic del Prestige II. A més, aquest biomarcador permet detectar possibles efectes adversos en la salut, com el risc de patir càncer (Norppa *et al.*, 2006 i Au, 2007).

1.3. Tipus de cultius de limfòcits de sang perifèrica

En els estudis de genotoxicitat és habitual l'ús de cultius de limfòcits de sang perifèrica, junt amb d'altres tipus de mostres com el raspat de cèl·lules bucals que es pot fer servir per al test de micronuclis i l'assaig cometa. Un dels principals avantatges dels limfòcits front d'altres tipus de teixits, és que circulen per tot el cos i entren en contacte fàcilment amb agents tòxics (o els seus metabòlits), encara que aquest actuï de manera específica sobre només alguns òrgans o teixits determinats (Au, 2007). Aquest fet és especialment important en el cas d'agents genotòxics, com el fuel, que necessiten ser metabolitzats en determinats teixits per produir l'efecte genotòxic (Amat-Bronnert *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Així, el dany observat en els limfòcits reflecteix bastant bé el dany generat en altres tipus cel·lulars (Hagmar *et al.*, 1994, 2004; Bonassi *et al.*, 2008; Rossner *et al.*, 2005). A més, els limfòcits, al no dividir-se, permeten el manteniment d'alteracions estructurals inestables durant tota la seva vida, reflectint l'efecte de l'exposició durant molt temps (uns sis anys).

Cultius de limfòcits de 48 h

Els cultius de limfòcits de 48 h permeten la detecció màxima d'alteracions cromosòmiques, ja que les cèl·lules es troben en la primera divisió mitòtica, és a dir, són les primeres cèl·lules metafàsiques que s'observen després de l'exposició. La freqüència d'alteracions

cromosòmiques desequilibrades disminueixen en les successives generacions de cèl·lules ja que les més danyades entren en apoptosi o necrosi. Aquests fets fan que els cultius de 48 h siguin els cultius estàndards en estudis de genotoxicitat (Albertini *et al.*, 2000).

En el Prestige I es van utilitzar només els cultius de limfòcits de 72 h per tal d'assegurar un bon creixement cel·lular que podia veure's afectat pel temps transcorregut des de l'obtenció de la mostra fins a la realització del cultiu o pel transport des de les confraries al nostre laboratori (1100km). Un cop comprovat el bon creixement cel·lular (Monyarch, 2010), en els estudis del Prestige II es va decidir incloure els cultius de 48 h i 72 h, per tal de mesurar més acuradament el dany cromosòmic i per comparar el nivell de dany entre els dos cultius.

Cultius de limfòcits tractats amb afidicolina

L'afidicolina és un agent químic que inhibeix el normal funcionament de l'ADN polimerasa alfa, entre d'altres polimerases, generant lesions cromosòmiques i alteracions cromosòmiques estructurals en les cèl·lules tractades (Bryant i Johnston, 1993). El dany cromosòmic en cultius tractats amb afidicolina és un reflex dels errors en la reparació de l'ADN.

La comparació del dany cromosòmic en presència d'afidicolina en els grups E i NE permet conèixer si els individus exposats al fuel presenten errors en la reparació de l'ADN.

1.4. Temps transcorregut per realitzar l'estudi de seguiment

Tenint en compte que la vida mitja dels limfòcits en sang perifèrica és d'entre cinc i set anys (Sprent i Tough, 1994), es va decidir programar la recollida de mostres per l'estudi de seguiment del Prestige II, sis anys després del vessament, quan la major part dels limfòcits ja s'haurien renovat des del moment de l'exposició. D'aquesta manera, el dany observat seria un reflex de les alteracions produïdes pel fuel en les cèl·lules mare de la medul·la òssia o degudes a una exposició continuada al fuel que generés nous trencaments en els limfòcits.

1.5. Estudi de seguiment

Un estudi de seguiment requereix analitzar els mateixos individus exposats a un agent genotòxic, emprant les mateixes tècniques o biomarcadors. Fins ara, no hi ha cap estudi genotòxic de seguiment, a mig o llarg termini, de l'efecte de l'exposició aguda al fuel. El present treball es troba inserit dins d'un estudi més ampli del dany cromosòmic associat a l'exposició aguda al fuel en el que s'han analitzat la majoria dels individus estudiats anteriorment.

Per l'estudi de seguiment, Prestige I vs Prestige II, hem comparat els resultats citogenètics obtinguts en els mateixos individus, utilitzant el mateix tipus de cultiu (72 h). A l'hora de fer l'estudi estadístic les comparacions s'han realitzat sempre entre Prestige I i Prestige II (72 h), per una banda, i entre Prestige II (48 h i 72 h), per altra. No hem realitzat la comparació entre Prestige I (72 h) i Prestige II (48 h), ja que varia el temps de cultiu i de recollida de mostres, de manera que les diferències en el dany cromosòmic no podien ser atribuïdes al temps transcorregut entre els dos estudis. Així doncs en el present treball s'ha realitzat un estudi de seguiment indirecte.

L'estudi de l'efecte del fuel sobre la reparació de l'ADN, realitzat en cultius tractats amb afidicolina, sí que és un estudi de seguiment en sentit estricte, ja que s'han analitzat els mateixos individus, dos i sis anys després de l'exposició, utilitzant exactament la mateixa tècnica, la qual cosa ens permet comprovar l'evolució de la reparació de l'ADN, al llarg del temps.

1.6. Limitacions de l'estudi

El present estudi, al igual que els anteriors (Prestige I 72 h i Prestige II 72 h), inclou el seu propi grup de referència (individus NE). En aquests treballs no podem parlar d'individus control sinó de NE, ja que, encara que no van participar en les tasques de neteja, al residir en zones de baixa contaminació, no podem descartar cert nivell d'exposició ambiental al fuel.

Altra limitació és la variabilitat interindividual, detectada en el Prestige I i en el Prestige II (Monyarch, 2010; Hildur, 2012), així com en la resta d'estudis genotòxics sobre l'exposició aguda al fuel o ocupacional al benzè (Pérez-Cadahía *et al.*, 2007, 2008b; Paz-y-Miño *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2008). Al llarg del nostre treball hem trobat individus NE amb moltes

lesions/alteracions cromosòmiques i individus E sense lesions/alteracions, de manera que els valors obtinguts s'han d'interpretar no com a dades individuals sinó com una mitjana dels grups E i NE.

Un punt crític de l'estudi del Prestige II ha estat la inclusió de nous individus NE, no estudiats a Prestige I, per tal d'equiparar el nombre d'individus estudiats en ambdós grups (E i NE). Encara que els nous NE complien tots els criteris de selecció, els resultats citogenètics obtinguts eren diferents en funció de si s'inclouen, o no, els nous individus. Un posterior estudi de les contestacions als qüestionaris no va detectar cap aspecte que pogués explicar aquets resultats. Les nostres troballes evidencien un possible biaix i posen de manifest que en els estudis de seguiment només s'han d'incloure els mateixos individus que ja havien estat estudiats prèviament.

2. Efecte genotòxic sis anys després de l'exposició aguda al fuel: Estudi de seguiment

L'efecte genotòxic de l'exposició al fuel en els estudis del Prestige I i Prestige II, realitzats pel nostre grup, s'ha analitzat utilitzant dos biomarcadors: lesions i alteracions cromosòmiques. L'anàlisi de lesions cromosòmiques ha inclòs gaps i trencaments. Els gaps han estat inclosos, en els nostres estudis, per tal de no infravalorar el dany genotòxic causat pel fuel.

En els diferents treballs que utilitzen com a biomarcador les alteracions cromosòmiques, no hi ha consens sobre la idoneïtat, o no, de la inclusió de les lesions cromosòmiques i menys encara sobre la inclusió dels gaps. De 17 publicacions que estudien diferents agents genotòxics i utilitzen com biomarcadors alteracions cromosòmiques estructurals i lesions cromosòmiques (Anderson *et al.*, 1996; Tunca i Egeli, 1996; Bogadi-Sare *et al.*, 1997; Liou, 1999; Kasuba *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Hagmar *et al.*, 2004; Celik *et al.*, 2005 i 2007; Rossner *et al.*, 2005; de la Chica *et al.*, 2005; Tompa *et al.*, 2005; Boffetta *et al.*, 2006; Roma-Torres *et al.*, 2006; Bonassi *et al.*, 2008; Paz y Miño *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010), nou agrupen les alteracions cromosòmiques estructurals i les lesions com un únic paràmetre, de manera que no podem saber la rellevància de les lesions com a biomarcador genotòxic (Anderson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002; Hagmar *et al.*, 2004; Rossner *et al.*, 2005; Tompa *et al.*, 2005; Boffetta *et al.*, 2006; Bonassi *et al.*, 2008; Paz y Miño *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010). A part, dels 17 estudis, vuit tenen en compte les alteracions cromosòmiques i els trencaments, però no els gaps (Bogadi-Sare *et al.*, 1997;

Kasuba *et al.*, 2000; Hagmar *et al.*, 2004; Rossner *et al.*, 2005; Boffetta *et al.*, 2006; Celik *et al.*, 2005 i 2008; Bonassi *et al.*, 2008) i només nou analitzen, com el nostre estudi, gaps, trencaments i alteracions cromosòmiques (Anderson *et al.*, 1996; Tunca i Egeli, 1996; Liou, 1999; Zhang *et al.*, 2002; de la Chica *et al.*, 2005; Tompa *et al.*, 2005; Roma-Torres *et al.*, 2006; Paz y Miño *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010). D'aquestes nou només en tres articles han trobat alguna relació entre les lesions cromosòmiques i l'agent genotòxic estudiat (Tunca i Egeli, 1996; Liou, 1999; de la Chica *et al.*, 2005). Tunca i Egeli (1996) troben un efecte positiu tan per a gaps com per a trencaments, Liou (1999) només observa una relació amb els trencaments de cromosoma i de la Chica *et al.* (2005) detecta una relació entre l'agent genotòxic i la suma de gaps i trencaments. Cal esmentar que en aquests tres treballs s'havia analitzat alhora un altre biomarcador (alteracions cromosòmiques estructurals, SCE, assaig cometa...) que sí presentaven una relació clara amb l'agent genotòxic. Aquesta dispersió de dades entre els diferents autors dificulta molt la comparació de les nostres dades amb altres estudis genotòxics duts a terme per a diferents agents químics.

2.1. Dany genotòxic detectat dos i sis anys després de l'exposició al fuel: Estudis SEPAR-Prestige

L'objectiu del present treball era determinar si el dany cromosòmic que s'havia detectat quatre anys abans en individus E persistia, havia desaparegut o augmentava.

Quan vam decidir incloure la realització de cultius de 48 h, en el Prestige II, per avaluar si el temps de cultiu dels limfòcits influeix en el grau de dany cromosòmic detectat esperàvem observar un augment de lesions i alteracions a 48 h respecte a 72 h, ja que el nombre màxim de lesions cromosòmiques en limfòcits obtinguts d'individus exposats, té lloc en la primera generació de cèl·lules metafàsiques (cultius de 48 h), tal i com s'ha explicat anteriorment.

Quan comparem les lesions cromosòmiques detectades en cultius de 48 h en el conjunt de la població estudiada en aquest treball (inclosos els 21 individus nous) observem un augment inesperat a NE del nombre de lesions cromosòmiques. Aquests resultats per si sols suggereixen que l'efecte genotòxic del fuel ha desaparegut sis anys després de l'exposició. En canvi, quan només analitzem els individus comuns als tres estudis del Prestige (Prestige I 72 h, Prestige II 48 h i Prestige II 72 h), sense incloure els individus

nous, no es troben diferències per a les lesions cromosòmiques, entre ambdós grups. Aquesta discrepància en els resultats en funció de la inclusió/exclusió d'individus nous en l'anàlisi estadístic, coincideix amb l'observat prèviament per Hildur (2012), i confirma que per poder establir un bon disseny experimental en els estudis de seguiment només s'han d'incloure els individus prèviament analitzats.

En cap dels tres estudis s'han trobat diferències entre E i NE en relació a les lesions cromosòmiques. Les úniques diferències detectades entre Prestige I (72 h) i Prestige II (72 h) i entre cultius de 48 h i 72 h (Prestige II) són degudes al nombre de gaps que, inesperadament, augmenten amb el temps transcorregut des de l'exposició al fuel i disminueixen en cultius de 48 h. Dels nou estudis genotòxics publicats que inclouen l'anàlisi de gaps, sis no van trobar cap relació entre l'exposició a l'agent analitzat i el nombre de gaps (Anderson *et al.*, 1996; Tunca i Egeli, 1996; Liou, 1999; Zhang *et al.*, 2002; de la Chica *et al.*, 2005; Tompa *et al.*, 2005; Roma-Torres *et al.*, 2006; Paz y Miño *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010). A més, no s'han trobat diferències en el nombre de trencaments en cap dels nostres estudis, entre E i NE. Aquests resultats semblen indicar que les lesions cromosòmiques no són un bon biomarcador dos anys després de l'exposició al fuel.

En els tres estudis, Prestige I (72 h) i Prestige II (48 h i 72 h), el nombre d'alteracions estructurals desequilibrades és molt major que el d'equilibrades i són les responsables de les diferències trobades entre els paràmetres estudiats: exposició al fuel (E i NE), temps d'obtenció de les mostres (2 i 6 anys) i temps de cultiu (48 i 72 h).

Si comparem les alteracions cromosòmiques estructurals detectades en cultius de 48 h, no s'observen diferències, entre E i NE, ni en el total d'alteracions estructurals ni en cap tipus d'alteració, ni analitzant la sèrie completa ni incloent només els individus comuns. En el grup E no hem trobat diferències en les alteracions estructurals entre els estudis realitzats dos i sis anys després de l'exposició (Prestige I 72 h i Prestige II 72 h). Aquests resultats semblen indicar que el dany cromosòmic detectat s'ha estabilitzat. Els tres estudis (Prestige I 72 h i Prestige II 48 h i 72 h) han detectat un percentatge d'alteracions estructurals (especialment desequilibrades) entre 2 i 3 vegades superior al "normal" descrit per altres autors per a la població general (0,35 - 4,6% amb un promig de 2,1%) (revisat per Monyarch, 2010; Suspiro i Prista, 2011). A més, la freqüència d'alteracions estructurals desequilibrades en individus no fumadors, amb edats semblants a les nostres (50 i 59 anys)

és de 2,38% (Tawn i Whitehouse 2001), clarament inferior a les observades en els nostres resultats (5,7% a E i 6,4% a NE). Així doncs, l'elevat dany cromosòmic en el grup E que, com a mínim, duplica la incidència "normal" de la població, suggereix que hi ha una persistència dels danys sis anys després de l'exposició.

El dany cromosòmic detectat en els individus E pot reflectir l'afectació de les cèl·lules mare de la medul·la òssia, donat que la vida mitja dels limfòcits de sang perifèrica oscil·la entre els cinc i set anys (Sprent i Tough, 1994) i que les mostres van ser recollides sis anys després del vessament. L'afectació de la medul·la òssia generaria, de manera continuada, limfòcits amb alteracions clonals, que no han estat observades en el present treball, en els individus E, però sí en el cas del Prestige II 72 h (Hildur, 2012). Aquests resultats estarien també avalats pel fet que el benzè, un dels principals compostos del fuel, és capaç d'induir alteracions cromosòmiques en les cèl·lules mares hematopoètiques (revisat per Wang *et al.*, 2012). No obstant, no podem descartar la presència d'un percentatge reduït de limfòcits residuals, que encara no haguessin esgotat la seva vida útil des del moment de l'exposició al fuel.

L'increment, en el grup NE, de les alteracions estructurals en Prestige II (72 h) respecte a Prestige I (72 h) ens indica que han empitjorat en els quatre anys transcorreguts entre els dos estudis. L'augment de les alteracions cromosòmiques detectades en el grup NE va ser observada també en l'estudi genotòxic del Prestige II (72 h). És interessant destacar que en altres estudis del Projecte SEPAR-Prestige, realitzats amb els mateixos individus, també s'ha observat un augment de símptomes respiratoris i de marcadors de l'estrès oxidatiu sis anys després de l'exposició (Zock *et al.*, 2012). Aquests resultats indiquen que el fet de no trobar diferències entre els grups E i NE a Prestige II, no és degut a la disminució del dany cromosòmic detectat en E en el Prestige I sinó a l'empitjorament dels NE. En el següent apartat discutirem quins factors han pogut contribuir a aquest augment del dany cromosòmic en el grup NE.

El nombre d'alteracions cromosòmiques estructurals és similars en cultius de 48 h i 72 h, tan per a E com per a NE. Aquests resultats suggereixen que el temps de cultiu no afecta a la presència d'alteracions cromosòmiques estructurals i que el dany detectat amb cultius de 72 h en el Prestige I no estaria subestimat.

2.2. Increment de dany cromosòmic en individus no exposats al fuel

L'augment del dany cromosòmic en els individus NE observat en el present treball va ser inesperat, encara que va ser descrit en l'estudi, realitzat en paral·lel, del Prestige II 72 h (Hildur, 2012). Una possible explicació de l'augment del dany cromosòmic en els individus NE és l'existència d'una exposició secundària al fuel, per l'alimentació (Hildur 2012) o per l'exposició als residus de fuel recuperats durant les tasques de neteja. Aquesta exposició secundària al fuel afectaria tan E com NE.

En el cas de l'alimentació, podem suposar que al tractar-se de mariscadors i pescadors de la zona, la seva dieta és molt rica en peix i marisc. Compostos químics del fuel com els HAPs, són resistents a la degradació i s'acumulen en organismes del fons oceànic, com els musclos (Bro-Rasmussen, 1996; Pérez-Cadahía *et al.*, 2004; Laffon *et al.*, 2006a). Aquests musclos poden transmetre les substàncies tòxiques del fuel que acumulen, al llarg del temps, a les persones que s'alimenten d'ells. Aquesta suposició coincideix amb els resultats de l'estudi de Lemiere *et al.* (2005) que va alimentar rates amb musclos contaminats amb HAPs, observant que presentaven un major dany genotòxic, utilitzant com biomarcador l'assaig cometa, en les cèl·lules del fetge i de la medul·la òssia, però no en limfòcits procedents de sang perifèrica. Resultats semblants, utilitzant com biomarcadors la concentració d'EROD i l'expressió de CYP1A1 i de GAPDH, es van obtenir després d'analitzar el fetge de rates que havien estat alimentades amb musclos contaminats pel fuel vessat per l'Erika (Chaty *et al.*, 2008). A més, la ingesta d'aliments contaminats amb benzè o HAPs, principals components del fuel, ha sigut reconeguda per la IARC (2012) com una de les principals fonts de l'exposició ambiental al benzè en la població general. La ingesta d'aquests aliments contaminants augmenta la incidència de diferents tipus de càncers: gola, tracte digestiu superior, colon i mama (Goldman i Shields, 2003; Sutandyo *et al.*, 2010).

L'exposició al fuel durant el emmagatzematge/tractament incorrecte dels residus recuperats durant les tasques de neteja pot constituir un altre factor, no descrit fins ara, que explicaria els efectes genotòxics detectats en els individus NE. Un cop finalitzades les tasques de neteja, es van recollir unes 90.000 tones de residus de fuel barrejats amb aigua, sorra i plàstics, la majoria dels quals (60.000) van ser emmagatzemats en una planta de tractament de residus perillosos situada a la comarca de As Somozas, a uns 50km de distància de la majoria de les nostres confraries NE (Fig. 23).



Figura 23. Imatge dels residus de fuel emmagatzemats en As Somozas.

Segons la legislació vigent, el tractament d'aquests residus i la seva inestització s'hauria d'haver produït en un temps màxim de 6 mesos des de la finalització de les tasques de neteja. No obstant això, per problemes econòmics amb la Xunta de Galícia, l'empresa gestora (Sogarisa), no va començar el tractament dels residus fins a l'any 2007. La majoria de les 90.000 tones van ser tractades entre 2007 i 2009, però van restar 10.000 tones que van quedar fora del pressupost inicial i que continuen emmagatzemades en As Somozas*. La recollida de les mostres del present estudi es va realitzar entre novembre de 2008 i abril de 2009. Molts dels NE poden haver estat exposats a emanacions d'aquests residus entre les obtencions de les mostres del Prestige I i del Prestige II.

L'alimentació amb productes contaminats i l'exposició ambiental als residus del fuel són especialment rellevants si tenim en compte que no s'ha descrit un llindar, per l'exposició al benzè, per sota del qual no hi hagin efectes genotòxics associats (Surrallés *et al.*, 1997). Tots dos fenòmens podrien explicar perquè els individus NE presenten un nivell de danys, en l'ADN, dos vegades superior al "normal". Concentracions de benzè en l'aire inferiors a 1 ppm, activen el metabolisme del benzè, produint metabòlits reactius que ataquen l'ADN, augmentant el risc a patir càncers hematològics (Rappaport *et al.*, 2013).

*http://elpais.com/diario/2007/10/23/galicia/1193134694_850215.html,

http://adega.info/info/090121joomla/files/residuos/Residuos_Prestige_SOGARISA.pdf,

http://www.eldiario.es/galicia/tratan-desechos-Prestige_0_69643129.html

A banda de la possible exposició continuada al fuel, o als seus residus, no podem descartar la presència, en l'ambient, d'altres agents genotòxics que siguin els responsables de les alteracions observades i que actuïn, igualment, sobre els individus E i NE.

3. Bandes cromosòmiques més afectades per l'exposició aguda al fuel

Fins ara, els estudis genotòxics del projecte SEPAR-Prestige (Monyarch, 2010; Hildur, 2012; present treball) són els únics que analitzen si l'exposició aguda al fuel afecta preferentment alguna regió del genoma. Els diferents treballs que analitzen els efectes de l'exposició al fuel del Prestige no han utilitzat ni lesions ni alteracions cromosòmiques estructurals com biomarcadors (Gestal *et al.*, 2004; Laffon *et al.*, 2006a; Pérez-Cadahía *et al.*, 2007, 2008a, 2008b, 2008c). En relació a l'exposició crònica al benzè, la majoria d'estudis que analitzen lesions i alteracions estructurals, no especifiquen la seva localització en l'idiograma humà (Anderson *et al.*, 1996; Tunca i Egeli, 1996; Forn, 1996; Bogadi-sare *et al.*, 1997; Kasuba *et al.*, 2000; Celik i Akbas, 2005; Tompa *et al.*, 2005; Roma-Torres *et al.*, 2006; Celik *et al.*, 2007; Paz-y-Miño *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010). Només hi ha quatre treballs que especifiquen les bandes que s'han trobat especialment afectades per l'exposició crònica al benzè (Sasiadek *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1998a; Stillman *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2002). No obstant, és ben conegut que alguns agents químics indueixen trencaments en determinades regions del genoma, cromosomes i bandes cromosòmiques (Nakagome *et al.*, 1983, Porfirio *et al.*, 1989; Tedeschi *et al.*, 1991).

En els individus E, estudiats en aquest treball, s'ha observat que la distribució, en l'idiograma humà, dels punts de trencament implicats en lesions i alteracions cromosòmiques estructurals no és uniforme, localitzant-se en 115 bandes cromosòmiques diferents (vs 111 bandes en el grup NE). No obstant, no podem assegurar que les bandes detectades com més afectades siguin les úniques sensibles al fuel, donat que alguns trencaments poden passar desapercebuts al microscopi òptic (Obe *et al.*, 2002). S'ha trobat que el cromosoma 17 i els braços cromosòmics 8p i 17q presenten un augment del nombre de trencaments en el grup E, dels quals, només el cromosoma 17 també va estar especialment afectat en el Prestige II 72 h. En estudis previs, sobre l'exposició crònica al benzè, s'havien detectat com especialment afectats els cromosomes 2, 4 i 7 i els braços

cromosòmics 5q i 7q (Sasiadek *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1998), cap d'ells coincideix amb els nostres resultats.

Característiques genòmiques de les bandes més afectades per l'exposició aguda al fuel

Per estudiar el patró d'acció del fuel, s'han analitzat les característiques genòmiques de les bandes que s'han vist afectades per lesions cromosòmiques o alteracions cromosòmiques estructurals, tan en individus E com en NE. Entre les característiques analitzades s'han inclòs el patró de bandes G, si contenen llocs fràgils o regions riques en duplicacions segmentàries, variacions en el nombre de còpies (CNVs) i microARNs (Annex 9). Aquesta informació s'ha obtingut a partir de dues bases de dades (<http://projects.tcag.ca/variation/> i <http://genome.ucsc.edu/>). Cap d'aquestes característiques explica una acció específica del fuel donada la similitud observada entre els grups E i NE, observant-se que, les bandes amb trencaments majoritàriament coincideixen amb bandes G clares, llocs fràgils, duplicacions segmentàries, CNVs i microARNs (Taula 24).

Taula 24. Característiques genòmiques de les bandes amb trencaments en els grups E i NE

Coincidència amb	Grup E	Grup NE	Comuns E i NE
Total bandes	115	111	57
Patró de bandes G clares	68,70%	67,57%	75,44%
Llocs fràgils (HGM11, 1991)	42,61%	37,84%	43,86%
Llocs fràgils (Mrasek <i>et al.</i> , 2010)	84,35%	84,68%	89,09%
Duplicacions segmentàries	100,00%	97,30%	92,98%
Variació del nombre de còpies (CNVs)	100,00%	100,00%	100,00%
microARN	85,22%	84,68%	80,70%
Bandes cromosòmiques en Prestige I	40,87%	44,14%	35,09%
Bandes cromosòmiques en Prestige II-72 h	53,04%	55,86%	59,65%

Les bandes G clares (riques en gens transcripcionalment actius) es veuen més afectades per trencaments que les bandes G fosques, tan en E com en NE. La pròpia estructura molecular de les bandes G clares explica que siguin més propenses a patir trencaments, fenomen que ha estat àmpliament descrit en la literatura (Barrios *et al.*, 1989; Fuster *et al.*, 1989; Martínez-López i Tomaso, 2006).

El grau de coincidència, detectat en els grups E i NE, entre les bandes amb trencaments i la localització de llocs fràgils ha estat molt diferent (42,61% vs 84,35%) en funció de si utilitzem la classificació de HGM11 (1991) o la proposada per Mraseck *et al.* (2010) degut al diferent nombre de LF. Els LF tenen una major quantitat de regions amb seqüències d'alta flexibilitat que poden afectar el control de la replicació de l'ADN i la condensació de la cromatina, fent aquestes regions més sensibles als trencaments (Zlotorinski *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2006).

Pràcticament el 100% de les bandes afectades contenen regions riques en duplicacions segmentàries i CNVs. No obstant, la similitud observada entre E i NE descarta una acció específica del fuel en aquestes regions del genoma que han estat descrites com regions associades a inestabilitat cromosòmica per Sharp *et al.* 2005. Aproximadament, el 85% de les bandes amb trencaments co-localitzen amb microRNAs, donat que, darrerament, s'ha descrit que els microRNAs es troben de forma preferent en llocs fràgils (Calin *et al.*, 2004 i Lagana *et al.*, 2010) aquests resultats no mostrarien tampoc cap acció específica del fuel ja que no s'han observat diferències entre E i NE.

La coincidència entre les bandes afectades en el present treball i els altres dos estudis (Prestige I, 72 h i Prestige II, 72 h) és similar en E i NE indicant que no hi ha un efecte atribuïble al fuel. El grau de coincidència entre les bandes més afectades és major entre els dos estudis del Prestige II (48 h i 72 h) que s'explicaria per ser estudis realitzats tots dos sis anys després de l'exposició al fuel.

Bandes més afectades per l'exposició al fuel: 17q21 i 8p23

L'estudi de les bandes cromosòmiques més afectades pel fuel ha estat realitzat mitjançant dos anàlisis estadístiques complementaris (apartat 6.1 de materials i mètodes). Només s'han considerat com especialment afectades per l'exposició al fuel aquelles bandes que han estat detectades per tots dos mètodes.

El nostre estudi ha permès determinar que en el grup E les bandes més afectades pels trencaments han estat la 17q21 i la 8p23. La banda 17q21 també és una de les més afectades en l'estudi del Prestige II amb cultius de 72 h (Hildur, 2012), suggerint que es tracta d'una regió especialment sensible al fuel. No obstant, aquesta banda no ha estat descrita ni en l'estudi del Prestige I ni en els pocs estudis sobre l'efecte genotòxic del benzè que especifiquen les bandes més afectades per trencaments cromosòmics (revisat per Holeckova *et al.*, 2004). Sasiadek *et al.* (1992), estudiant treballadors ocupacionalment exposats al benzè, van trobar especialment afectades les bandes 4q21 i 7q22 així com la regió centromèrica del cromosoma 2, emprant bandes G, mentre que Marcon *et al.* (2002) van trobar la banda 1q12 com la més afectada en treballadors de benzineres, mitjançant sondes específiques de FISH. Dos estudis en els que s'analitzen els efectes *in vitro* de la hidroquinona (un metabòlit del benzè) amb FISH, han descrit la banda 5q31 com especialment afectada estudiant limfòcits (Zhang *et al.*, 1998a) i cèl·lules mare de la medul·la òssia (Stillman *et al.*, 2000).

S'han analitzat les característiques genòmiques de les bandes 17q21 i 8p23 i s'han identificat els gens que es troben localitzats en elles. Les dues bandes corresponen amb bandes G clares, riques en AT, gens transcripcionalment actius, duplicacions segmentàries, CNVs i microRNAs. En ambdues bandes s'ha descrit un nou lloc fràgil, el FRA17D en la 17q21 i el FRA8G en la 8p23 (Mrasek *et al.* 2010). És interessant destacar que la banda 17q21 està implicada en la inversió polimòrfica *inv17(q21-q31)* present en un 20% de la població europea (Stefansson *et al.*, 2005). En les dues bandes es localitzen gens implicats en el control del cicle cel·lular i en la reparació de l'ADN (Taula 24). L'alteració d'aquests gens, deguda a l'exposició al fuel, podria donar lloc a inestabilitat cromosòmica que predisposa a diferents tipus de malalties, com el càncer. Per establir si existeix una associació entre l'exposició aguda/crònica al fuel i l'alteració de gens específics són necessaris més estudis.

Taula 24. Gens localitzats en les bandes afectades pel fuel del Prestige

Bandes	Gens	Procés biològic en el que participa
8p23	PINX1	Gen supressor de tumors
	BLK	Proto-oncogen Proliferació i diferenciació cel·lulars
	MCPH1	Control de la proliferació cel·lular Resposta als danys en l'ADN
	NEIL2	Mecanisme de reparació per escissió de bases
17q21	BRCA1	Gen supressor de tumors Reparació de l'ADN Control del cicle cel·lular
	HTLVR	Receptor susceptible a la infecció per virus oncogènics
	CDC27	Control de la proliferació cel·lular
	RAD51C	Reparació de l'ADN
	RAB5C	Oncogen
	PHB	Control de la proliferació cel·lular
	CASC3	Oncogen

4. Efectes del fuel sobre la de reparació de l'ADN

En el present estudi, realitzat a partir de cultius de limfòcits tractats amb afidicolina (inhibidor de les ADN polimerases), s'ha observat que, tan en el Prestige I com en el Prestige II, els E presenten un increment en les lesions cromosòmiques respecte als NE. A més, en ambdós grups E i NE, les lesions cromosòmiques han disminuït amb el temps (Prestige II vs Prestige I). Donat que aquestes lesions reflecteixen errors en la reparació de l'ADN, podem dir que l'afectació dels sistemes de reparació de l'ADN, en E, era major dos anys després de la catàstrofe (Prestige I) i que ha anat disminuint, sense cessar del tot, sis anys després de l'exposició (Prestige II). El nostre estudi recolza que els cultius tractats amb inhibidors de les ADN polimerases (com l'afidicolina) són un excel·lent biomarcador per conèixer el funcionament dels sistemes de reparació de l'ADN, concretament el

sistema NER, tal i com s'ha proposat darrerament (Slyskova *et al.* 2011; Speit *et al.* 2013).

Diversos autors també han observat, en individus exposats crònicament al benzè, una menor capacitat de reparació de l'ADN (emprant radiació ionitzant en lloc d'afidicolina) (Hallberg *et al.*, 1997; Navasumrit *et al.*, 2005; Chanvaivit *et al.*, 2007). Aquests resultats, juntament amb els nostres, suggereixen un efecte del benzè/fuel en la reparació de l'ADN, tan a dosis cròniques com agudes.

5. Implicacions en la salut de l'exposició al fuel

Els efectes immediats en la salut dels participants en les tasques de neteja del fuel abocat pel Prestige han estat especialment estudiats en relació als problemes respiratoris (Gestal *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2006, 2007; Sabucedo *et al.*, 2010), només existeix un estudi de la seva repercussió a llarg termini (Zock *et al.*, 2012). Fins ara es desconeix l'efecte que el dany genotòxic detectat en aquests individus pot produir en la salut a llarg termini.

La utilització de les alteracions cromosòmiques estructurals com biomarcadors d'exposició, en el present estudi, té una especial rellevància donat que freqüències elevades de delecions i translocacions podrien ser utilitzades com biomarcadors d'estadis inicials en el desenvolupament del càncer (Stallings, 2007). Donada l'associació existent entre l'increment del dany cromosòmic i l'exposició al fuel, detectada en els tres estudis de genotoxicitat (Prestige I 72 h i Prestige II 48 h i 72 h), i la relació establerta entre l'augment de les alteracions cromosòmiques i el càncer (Hagmar *et al.*, 1994, 1998, 2004; Bonassi *et al.*, 2000; Bonassi *et al.*, 1995, 2000, 2008), cabria esperar un increment del risc a desenvolupar càncer en els individus exposats al fuel.

L'increment de dany cromosòmic detectat sis anys després d'exposició (Prestige II, 48 h i 72 h) indicaria l'afectació de la medul·la òssia degut a que la major part de limfòcits s'han renovat ja que la seva vida mitja és d'entre cinc i set anys (Sprent i Tought, 1984). Aquestes dades suggereixen que els individus exposats al fuel tenen un major risc de càncer hematològic. Recolzaria aquesta hipòtesi el fet que els individus crònicament exposats al benzè, un dels principals components del fuel, tenen un risc 20 vegades major de desenvolupar malalties hematològiques que la població general, particularment, leucèmies i limfomes (Aksoy, 1989; Hayes *et al.*, 1997; Smith i Zhang, 1998; Hayes *et al.*,

2001; Zhang *et al.*, 2002; Barregard *et al.*, 2009; revisat per Galbraith *et al.*, 2010; revisat per Khalade *et al.*, 2010; revisat per Smith, 2010; Vlaanderen *et al.*, 2011; Schnatter *et al.*, 2012; revisat per Snyder, 2012). A més, segons Norppa *et al.* (2006) el dany cromosòmic detectat en limfòcits de sang perifèrica reflecteix el dany produït també en altres teixits, per tant, els individus exposats al fuel podrien presentar altres tipus de càncers no hematològics. En l'estudi del Prestige II (Hildur, 2012) 7 individus (6 eren E i 1 NE) havien desenvolupat càncers no hematològics (pell, pròstata, colon, bufeta, úter i mama) entre dos i sis anys després de l'exposició al fuel.

Un altre possible efecte en la salut, dels participants en les tasques de neteja, podria ser degut a l'afectació de les cèl·lules germinals, produint alteracions en la fertilitat o en el desenvolupament embrionari. Fins ara, la majoria d'estudis d'infertilitat associada a l'exposició a algun agent genotòxic s'han realitzat en homes (Papachristou *et al.*, 2008). Diversos treballs demostren que l'exposició ocupacional al benzè està associada a un increment d'espermatozoides amb alteracions cromosòmiques estructurals i aneuploidies que poden causar infertilitat, avortaments espontanis, malformacions congènites i també retard mental (Xing *et al.*, 2010; Anton i Krawetz, 2011; Marchetti *et al.*, 2012). No hi ha cap estudi equivalent sobre l'efecte de l'exposició aguda al fuel però, donat que el benzè és un dels seus principals components, cabria esperar que l'exposició al fuel del Prestige produeixi, al menys, efectes similars als descrits en exposicions cròniques.

Donat que el nostre estudi s'ha realitzat en un grup d'individus molt exposat i altament seleccionat (1/1.000 voluntaris) hem de ser prudents, a l'hora d'extrapolar les nostres conclusions als 300.000 voluntaris que van col·laborar de manera puntual en les tasques de neteja del fuel.

Finalment, el present estudi mostra la necessitat de disposar d'un protocol d'actuació, en cas de vessaments accidentals de fuel, que inclogui la preparació del personal i la correcta utilització dels sistemes de protecció individuals. A més, queda palesa la necessitat de dur a terme exàmens clínics acurats en els individus exposats al fuel per tal de detectar etapes primerenques de càncer.

Conclusions

Conclusions

1.- Basant-nos en els nostres resultats i els obtinguts en Prestige I i Prestige II (72 h) podem concloure que les lesions cromosòmiques no són un bon biomarcador de genotoxicitat quan el temps transcorregut des de l'exposició al fuel és superior a dos anys, ja que no discriminen entre individus exposats i no exposats.

2.- El present treball, realitzat paral·lelament al del Prestige II 72 h, confirma que la inclusió de nous individus en l'estudi de seguiment, encara que compleixin els mateixos criteris de selecció, pot alterar els resultats. Per tant, per establir un bon disseny experimental en els estudis de seguiment només s'han d'incloure els individus prèviament analitzats.

3.- L'estudi genotòxic de seguiment, analitzant només els individus comuns als tres estudis, Prestige I (72 h) i Prestige II (72 h i 48 h), ha revelat que el nombre d'alteracions cromosòmiques estructurals:

- No varia en funció del temps de cultiu (48 h i 72 h, Prestige II) indicant que l'anàlisi amb cultius de 72 h a Prestige I no va subestimar els danys cromosòmics en els individus estudiats.
- En individus exposats és entre dos i tres vegades superior al de la població general, en els tres estudis, mostrant que l'efecte genotòxic detectat dos anys després de l'exposició persisteix quatre anys després.
- En individus no exposats augmenta al llarg del temps (Prestige I 72 h vs Prestige II 72 h), suggerint que aquests individus han estat sotmesos a una exposició secundària al fuel (pel consum d'aliments contaminats o per l'exposició als residus emmagatzemats) o a algun altre agent genotòxic, que els ha fet empitjorar en el temps transcorregut entre ambdós estudis.

4.- Els punts de trencament cromosòmics detectats, tan en individus exposats com en no exposats, es localitzen preferentment en llocs fràgils i en regions riques en gens transcripcionalment actius (bandes G clares), en duplicacions segmentaries i en CNVs.

Aquests resultats, junt amb els observats en estudis anteriors del Prestige revelen que la distribució dels punts de trencaments produïts pel fuel no mostren un patró específic.

5.- Les bandes cromosòmiques més sensibles al fuel en individus exposats són la 8p23 i la 17q21. La banda 17q21 també va ser una de les més afectades en l'estudi Prestige II 72 h. En aquesta banda s'han descrit diversos gens implicats en el control del cicle cel·lular i en la reparació de l'ADN.

6.- Els cultius amb afidicolina mostren que l'augment del dany cromosòmic detectat en individus exposats al fuel, tan en Prestige I com en Prestige II, està associat a errors en la reparació de l'ADN.

7.- L'interès socio-sanitari dels nostres resultats, posa de manifest la necessitat de portar a terme estudis semblants que permetin confirmar si l'exposició accidental al fuel incrementa el risc de desenvolupar càncer.

Bibliografia

A

- Abrusan G i Krambeck HJ. 2006. Competition may determine the diversity of transposable elements. *Theor Popul Bio*, 70: 364-375.
- Acharya S, Wilson T, Gradia S *et al.* 1996. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 13629-13634.
- Aguilera F, Méndez J, Pasaro E, Laffon B. 2010. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *J Appl Toxicol*, 30:291-301.
- Aksoy M. 1989. Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene. *Environ Health Perspect*, 32: 193-197.
- Albaigés J, Morales-Nin B, Vilas F. 2006. The Prestige oil spill: a scientific response. *Mar Pollut Vull*, 53:205-207.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, *et al.* 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463: 111-172.
- Amat-Bronnert A, Castegnaro M i Pfohl-Leszkowicz A. 2007. Genotoxic activity and induction of biotransformation enzymes in two human cell lines after treatment by Erika fuel extract. *Environ Toxicol & Pharmacol*, 23: 89-95.
- Anderson D, Hughes JA, Cebulska-Wasilewska A, Wierzevska A i Kasper E. 1996. Biological monitoring of workers exposed to emissions from petroleum plants. *Environ Health Perspect*, 104: 609-613.
- Anderson D i Zeiger E. 1997. Human monitoring. *Environ Mol Mutagen*, 30: 95-96.
- Angerer J, Ewers U, Michael W. 2007. Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ Health*, 210:201-228.
- Anton E i Krawetz SA. 2011. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. *Syst Biol Reprod Med*, 58: 41-50.
- Arlt FM, Wilson TE, Glover TW. 2012. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr Opin Genet Dev*, 22: 204-210.
- Au WW. 2007. Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *Int J Hyg Environ Health*, 210: 239-246.
- Au WW. 2010. Challenge assay: a functional biomarker for exposure-induced DNA repair deficiency and for risk of cancer. *Int J Hyg Environ Health*, 213:32-39.

B

- Baars BJ. 2002. The wreckage of the oil tanker Erika - human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. *Toxicol Lett*, 128:55-68.
- Balansky R, Ganchev G i Iltcheva M *et al.* 2007. Potent carcinogenicity of cigarette smoke in mice exposed early in life. *Carcinogenesis*, 28:2236-2243.
- Barrett B, Stiles M i Patterson J. 2002. Radiation risks: critical analysis and commentary. *Prev Med*, 54:280-282.
- Barregard L, Holmsber E, Sallsten G. 2009. Leukaemia incidence in people living close to an oil refinery. *Environ Res*, 109: 985-990.
- Barrios L, Miro R, Caballin MR, Fuster C, Guedea F, Subias A i Egozcue J. 1989. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*, 41: 61-70.
- Ben Salah G, Kamoun H, Rebai A, Ben Youssef A, Ayadi H, *et al.* 2011. Sister chromatid exchange (SCE) and high-frequency cells (HFC) in peripheral blood lymphocytes of healthy Tunisian smokers. *Mutat Res*, 719: 1-6.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, *et al.* 2006. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from central Europe. *Am J Epidemiology*, 165: 36-43.

- Bogadi-Sare A, Brumen V, Turk R, Karacic V i Zavalic M. 1997. Genotoxic effects in workers exposed to benzene: with special reference to exposure biomarkers and confounding factors. *Industrials Health*, 35: 367-373.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá L, De Ferrari M, Degrassi F, *et al.* 1995. Are chromosomal aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? *Cancer Genet Cytogenet*, 79: 133-135.
- Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, *et al.* 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res*, 60: 1619-1625.
- Bonassi S, Lando C, Ceppi M, Landi S, Rossi AM, Barale R. 2004. No association between increased levels of high frequency sister chromatid exchange cells (HFCs) and the risk of cancer in healthy individuals. *Environ Mol Mutagen*, 43: 134-136.
- Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R i Tucker JD. 2005. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature an future prospectives. *Environ Mol Mut*, 45: 258-270.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, *et al.* 2007. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.
- Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, *et al.* 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, 29: 1178-1183.
- Bosch X. 2003. Prestige wreck. For Spain, oil spill disaster is in the bag. *Science*, 302:1485.
- Braoudaki M i Tzortzatou-Stathopolou F. 2011. Tumorigenesis related to retroviral infections. *J Infect Dev Ctries*, 5(11):751-758.
- Bryant PE i Johnston PJ. 1993. Restriction-endonuclease-induced DNA double-strand breaks and chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat Res*, 299: 289-296.
- Burgaz S, Karahalil B, Canli Z, *et al.* 2002. Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. *Hum Exp Toxicol*, 21: 129-135.
- Buttke D, Vagi S, Schnall A, Bayleyegn T, Morrison M, Allen M, Wolkin A. 2012. Community Assessment for Public Health Emergency Response (CASPER) one year following the Gulf Coast oil spill: Alabama and Mississippi, 2011. *Prehosp Disaster Med*. 27:496-502.
- C**
- Campbell D., Cox D., Crum J., Foster K., Christie P. i Brewster D. 1993. Initial effects of the grounding of the tanker Braer on health i n Shetland. The Shetland Health Study Group. *BMJ*, 307:1251-1255.
- Campbell D., Cox D., Crum J., Foster K. i Riley A. 1994. Later effects of grounding of tanker Braer on health in Shetland. *BMJ*, 309:773-774.
- Cárdenas-Bustamante O, Varona-Urbe M, Patiño-Florez RI, Groot-Restrepo H, Sicard-Suárez D, Tórres-Carvajal MM i Pardo-Pardo D. 2007. Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pintura en Bogotá. *Rev Salud Pública*, 9: 275-288.
- Carere A, Andreoli C, Galati R, Leopardi P, Marcon F, Rosati MV, *et al.* 2002. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes to traffic policemen. *Mutat Res*, 518: 212-224.

- Carrano AV i Natarajan AT. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*, 204: 379-406.
- Carrasco JM, Lope V, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Suárez B, López-Abente G, Rodríguez-Artalejo F i Pollan M. 2006. Association between health information, use of protective devices and occurrence of acute health problems in the Prestige oil spill clean-up in Asturias and Cantabria (Spain): a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 6:1.
- Carrasco JM, Pérez-Gómez B, García-Mendizabal MJ, Lope V, Aragonés N, Forjaz MJ, Guallar-Castillón P, Lopez-Abente G, Rodríguez-Artalejo F i Pollan M. 2007. Health-related quality of life and mental health in the medium-term aftermath of the Prestige oil spill in Galiza (Spain): a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 7:245.
- Casorelli I, Bossa C i Bignami M. 2012. Molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *Int J Environ Res Public Health*, 9: 2636-2657.
- Castanedo S, Juanes JA, Medina R, Puente A, Fernández F, Olabarrieta M i Pombo C. 2009. Oil spill vulnerability assessment integrating physical, biological and socio-economical aspects: application to the Cantabrian coast. *J Environ Manag*, 91: 149-159.
- Celik A i Akbas E. 2005. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotox & Environ Safety*, 60: 106-112.
- Celik M, Donbak L, Unal F, Yüzbasioğlu D, Aksoy H i Yilmaz S. 2007. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res*, 627: 158-163.
- Chanvaivit S, Navasumrit P, Hunsonti P, Autrup H i Ruchirawat M. 2007. Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. *Mutat Res*, 626: 79-87.
- Chen H i Eastmond DA. 1995. Topoisomerase inhibition by phenolic metabolites: a potential mechanism for benzene's clastogenic effects. *Carcinogenesis*, 16: 2301-2307.
- de la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J i Fuster C. 2005. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA*, 10: 1212-1222.
- Clare MG, Yardley-Jones A, Maclean AC i Dean BJ. 1984. Chromosome analysis from peripheral blood lymphocytes of workers after an acute exposure to benzene. *British J Indust Med*, 41:249-253.
- Clarkson SG i Wood RC. 2005. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: An appraisal. *DNA Repair*, 4: 1068-1074.
- Cole J, Beare DM, Waugh AP, Capulas E, Aldridge KE, Arlett CF, Green MH, Crum JE, Cox D, Garner RC, *et al.* 1997. Biomonitoring of possible human exposure to environmental genotoxic chemicals: lessons from a study following the wreck of the oil tanker Braer. *Environ Mol Mutagen*, 30:97-111.
- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, *et al.* Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 30: 139-146.
- Compton DA. 2011. Mechanisms of aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol*, 23: 109-113.
- Crum J.E. 1993. Peak expiratory flow rate in schoolchildren living close to Braer oil spill. *BMJ*, 307:23-24.

Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, Goldstein LS, Beland FA. 1996. DNA adduct measurement in relationship to small intestinal and forestomach tumour incidence during the chronic feeding of coal tar or benzo(alpha)pyrene to mice. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, 11: 161-168.

D

Daber RD, Conlin LK, Leonard LD, Canevini MP, Vignoli A, Hosain S, Brown LW, Spinner NB. 2012. Ring chromosome 20. *Eur J Med Genet*, 55: 381-387.

Dauer LT, Brooks AL, Hoel DG, Morgan WF, Stram D i Tran P. 2010. Review and evaluation of update research on the health effects associated with low-dose ionising radiation. *Radiat Prot Dosimetry*, 140(2):103-136.

Davoli T, Denchi EL i Lange T. 2010. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*, 141: 81-93.

Decodier I, Looock KV i Kirsch-Volders M. 2010. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutation Research*, 705: 107-129.

Dey S, Maiti AK, Hegde ML, Hegde PM, Boldogh I, Sarkar PS, *et al.* 2012. Increased risk of lung cancer associated with a functionally impaired polymorphic variant of the human DNA glycosylase NEIL2. *DNA Repair (Amst)*, 11: 570-578.

Dhillon VS, Husain SA i Ray GN. 2003. Expression of aphidicolin-induced fragile sites and their relationship between genetic susceptibility in breast cancer, ovarian cancer, and non-small cell lung cancer patients. *Terat, Carcin & Mutat Suppl*, 1: 35-45.

Dor F, Bonnard R, Gourier-Frery D, Cicolella A, Dujardin R i Zmirou D. 2003. Health risk assessment after decontamination of the beaches polluted by the wrecked Erika tanker. *Risk Anal*, 23:1199-1208.

Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R i Botta A. 1997. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis*, 12: 227-231.

E

Edwards AA. 1997. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. *Radiat Res*. 148: 39-44.

Edwards AA. 2000. Fluorescence in situ hybridation (FISH) biological dosimetry. *Radiat Port Dosim*, 88.

Ellinger-Ziegelbauer H, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ. 2009. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett*, 186:36-44.

Estensen RD, Jordan MM, Wiedmann TS *et al.* 2004. Effect of chemopreventive agents on separate stages of progression of benzo[alpha]pyrene induced lung tumors in A/J mice. *Carcinogenesis*, 14:1975-1977.

F

Farner P. 1995. Monitoring of human exposure to carcinogens through DNA and protein adduct determination. *Toxicol Lett*, 82-83.

Fenech M i Morley AA. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29-36.

Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*, 285: 35-44.

Fenech M, Pereppetskaya G i Mikhalevich L. 1997. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations - experiences from the chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mut*, 30: 112-118.

- Forni A. 1996. Benzene-induced chromosome aberrations: a follow-up study. *Environ Health Perspect*, 104:1309-1312.
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. 2003. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res*, 531: 127-139.
- Fox DT i Duronio RJ. 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*, 140: 3-12.
- Fracasso ME, Doria D, Bartoluxxi GB, Carrieri M, Lovreglio P, Ballini A, Soleo L, Tranfo G i Manno M. 2010. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicology letters*, 192: 22-28.
- Frantz CE, Chen H i Eastmond DA. 1996. Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. *Environ Health Perspect*, 104: 1319-1323.
- Fröhling S i Döhner H. 2008. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med*, 359: 722-734.
- Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, *et al.* 2013. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *Plos ONE*, 8(4): e60043.
- Fuster C, Miro R, Templado C, Barrios L, Moreno V i Egozcue J. 1989. Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements and in human sperm chromosomes. *Human Genet*, 82: 330-334.
- G**
- Galacher J, Bronsterning K, Palmer S, Fone D i Lyons R. 2007. Symptomatology attributable to psychological exposure to a chemical incident: a natural experiment. *J Epidemiol Community Health*, 61:506-512.
- Galbraith D, Gross SA i Paustenbach D. 2010. Benzene and human health: a historical review and appraisal of association with various diseases. *Critical Rev Toxicol*, 40: 1-46.
- Garmendía L, Soto M, Vicario U, Kim Y, Cajaraville MP i Marigómez I. 2011. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the *Prestige* oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *J Environ Monit*, 13: 915-932.
- Garte S, Popov T, Georgieva T, Bolognesi C, Taioli E, Bertazzi PA, Farmer P i Merlo DF. 2005. Biomarkers of exposure and effects in Bulgarian petrochemical workers exposed to benzene. *Chem-Biol Interact*, 153-154: 247-251.
- Gestal JJ, Smyth E, Figueiras A i Montes A. 2004. Recollida e limpeza do fuel do Prestige. Avaliación da exposición e danos a saúde en voluntarios e treballadores. Santiago de Compostela: Área de Medicina Preventiva e Saúde Pública da Universidade de Santiago de Compostela.
- Glover TW, Arlt MF, Casper AM i Durkin SG. 2005. Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet*, 14: 197-205.
- Glover TW. 2006. Common fragile sites. *Cancer Lett*, 232: 4-12.
- Goldman R i Shields PG. 2003. Food mutagens. *J Nutr*, 133: 965-973.
- Goldstein BD, Osofsky HJ i Lichtveld MY. 2011. The gulf oil spill. *N Engl J Med*, 364:1334-1347.
- Gordon DJ, Resio B i Pellman D. 2012. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*, 13:189-203.
- Grattan LM, Roberts S, Mahan Jr. WT, McLaughlin PK, Otwell WS i Morris Jr. JG. 2011. The Early Psychological Impacts of the Deepwater Horizon Oil Spill on Florida and Alabama Communities. *Environ Health Perspect*, 119: 838-843.

Greim H i Reuter U. 2001. Classification of carcinogenic chemicals in the work area by the German MAK Commission: current examples for the new categories. *Toxicology*, 166: 11-23.

H

Ha M, Lee WJ, Lee S i Cjepmg HK. 2008. A literature review on health effects of exposure to oil spill. *J Prev Med Public Health*, 41:345-354.

Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, *et al.* 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 54: 2919-2922.

Hagmar L, Bonassi S i Strömberg U. 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, 58: 4117-4121.

Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C i Norppa H. 2004. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res*, 64: 2258-2263.

Hallberg LM, Bechtold WE, Grady J, Legator MS i Au WW. Abnormal DNA repair activities in lymphocytes of workers exposed to 1,3-butadiene. *Mutat Res*. 383, 213-221.

Han HJ, Sudo K, Inasawa J i Nakamura Y. 1996. Isolation and mapping of human gene (RABL) encoding a small GTP-binding protein homologous to the Ras-related RAB gene. *Cytogenet Cell Genet*, 73: 137-139.

Hartwig A. 2010. The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis. *Chemico-Biological Interact*, 184: 269-272.

Hayes RB, Yin S-N, Dosemeci M, Li G-L, Wacholder S, *et al.* 1997. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. *J Nat Cancer Inst*, 89:1065-1071.

Hayes RB, Songnian Y, Dosemeci M i Linet M. 2001. Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am J Ind Med*, 40:117-126.

Hecht SS. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Nat Cancer Inst*, 14: 1194-1210.

Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D i Bartsch H. 1994. DNA adducts, identification and biological significance. IARC Scientific Publications, 125: 478.

Hildur K. 2012. Estudio citogenético de seguimiento de pescadores expuestos al fuel vertido por el petrolero Prestige. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Hoeijmakers JHJ. 2001. DNA repair mechanisms. *Maturitas*, 38: 17-23.

Hoeijmakers JHJ. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *N Eng J Med*, 361: 1475-1485.

Holecková B, Piesová E, Siviková K i Dianovský J. 2004. Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. *Ann Agric Environ Med*, 11: 175-179.

I

IARC. 1993. Cadmium and cadmium compounds. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 58:119-237.

IARC. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposure. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 92: 1-853.

IARC. 2012. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 100F: 1- 599.

- IPCS. 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environ Health Criteria*, 155, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 82pp.
- Infante PF i White MC. 1983. Benzene: epidemiologic observations of leukemia by cell type and adverse health effects associated with low-level exposure. *Environ Health Perspect*, 52:75-82.
- Ivics Z i Izsvak Z. 2010. Repetitive elements and genome instability. *Sem Cancer Biol*, 20:197-199.
- J**
- Jackson SP i Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461: 1071-1078.
- Janjua NZ, Kasi PM, Nawaz H, Farroqui SZ, Khuwaja UB, Najam ul H, Jafri SN, Lutfi SA, Kadir MM i Sathiakumar N. 2006. Acute health effects of the Tasman Spirit oil spill on residents of Karachi, Pakistan. *BMC Public Health*, 6:84.
- Jo YN, Kim HO, Lee J, Lee SS, Cho CH, Kang IS, Choe WJ, Baik HH i Yoon KS. 2013. MCPH1 protein expression and polymorphisms are associated with risk of breast cancer. *Gene*, 517: 184-190.
- Johnson A i O'Donnell M. 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem*, 74: 283-315.
- Jorgensen PM, Graslund S, Betz R, Stahl S, Larsson C i Hoog C. 2001. Characterisation of the human APC1, the largest subunit of the anaphase-promoting complex. *Gene*, 262: 51-59.
- K**
- Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N i Modrich P. 2006. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell*, 15: 31-41.
- Kaiser P. 1988. Pericentric inversions: their problems and clinical significance. *See Ref*, 22, 163-243.
- Khalada A, Jaakkola MS, Pukkala E i Jaakola JJK. 2010. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health*, 9:31-39.
- Kasuba V, Rozgaj R i Sentija K. 2000. Cytogenetic changes in subjects occupationally exposed to benzene. *Chemosphere*, 40: 307-310.
- Kazazian HHJr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 303: 1626-1632.
- Keretsetse GS, Laubscher PJ, Du Plessis JL, Pretorius PJ, Van Der Westhuizen FH, *et al.* 2008. DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of african petrol attendants: a pilot study. *Ann Occup Hyg*, 52:653-662.
- Kim MB, Park E, Lee An SY, Ha M, Kim EJ, Kwon H, Hong YC, Jeong WC, Hur J, Cheong HK, *et al.* 2009. BTEX exposure and its health effects in pregnant women following the Hebei Spirit oil spill. *J Prev Med Pub Health*, 42:96-103.
- Kim SR i Shaffer LG. 2002. Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genetic Testing*, 6: 163-168.
- Kim SY, Choi JK, Cho YH, Chung EJ, Paek D i Chung HW. 2004. Chromosome aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 14: 453-463.
- Kopjar N, Kasuba V, Rozgaj R, *et al.* 2009. The genotoxic risk in health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs - a comprehensive evaluation by the SCE assay. *J Environ Sci Health*. 44: 462-479.

- Kumari R, Singh KP i Dumond JW Jr. 2009. Simulated microgravity decreases DNA repair capacity and induces DNA damage in human lymphocytes. *J Cell Biochem*, 107:723-731.
- Kunz C, Saito Y i Schär P. 2009. DNA repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci*, 66: 1021-1038.
- Kurshid R, Sheikh MA, i Iqbal S. 2008. Health of people working7living in the vicinity of an oil-polluted beach near Karachi, Pakistan. *East Mediterr Health J*, 14:179-182.

L

- Laffon B, Rábade T, Pásaro E i Méndez J. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. 2006a. *Environ Int*, 32:342-348.
- Laffon B, Fraga-Iriso R, Pérez-Cadahía B i Méndez J. 2006b. Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *Food Chem Toxicol*, 44: 1714-1723.
- Lagana A, Russo F, Sismeiro C, Giugno R, Pulvirenti A i Ferro A. 2010. Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG island in the distribution of genetic material. *Plosone*, 5: e11166.
- Lai XF, Shen CX, Wen Z, Qian YH, Yu CS, Wang JQ, Zhong PN i Wang HL. 2012. PinX1 regulation of telomerase activity and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 31: 12.
- Lemiere S, Cossu-Leguille C, Bispo A, Jourdain MJ, Lanhers MC, Burnel D i Vasseur P. 2005. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by “Erika” oil spill. *Mutat Res*, 581: 11-21.
- Liou SH, Lung JC, Chen YH, Yang T, Hsieh LL, Chen CJ i Wu TN. 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res*, 59: 1481-1484.
- Littlefield LG i Joiner EE. 1986. Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of long-term heavy smokers. *Mutat Res*, 170: 145-150.
- Lee HO, Davidson JM i Duronio RJ. 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev*, 23: 2461-2477.
- Lyons RA, Temple JM, Evans D, Fone DL i Palmer SR. 1999. Acute health effects of the Sea Empress oil spill. *J Epidemiol Community Health*, 53:306-310.

M

- Madan K. 1988. Paracentric inversions and their clinical implications. *See Ref.* 22: 249-266.
- Marchetti F, Eskenaki B, Weldon RH, Li G, Zhang L, Rappaport SM, *et al.* 2012. Occupational exposure to benzene and chromosomal structural aberrations in the sperm of chinese men. *Environ Health Perspect*, 120: 229-234.
- Marcon F, Zijno A, Dobrowolny G, Carere AS i Crebelli R: Detection of 1cen-1q12 lesions in different phases of cell cycle: dual colour FISH aanalysis of peripheral lymphocytes from subjects with occupational exposure to petroleum fuels. *Mutagenesis*, 17: 157-162.
- Martínez-López W i Di Tomaso MV. 2006. Chromatin remodelling and chromosome damage distribution. *Hum Exp Toxicol*, 25: 539-545.
- Martino-Roth MG, Viégas J i Roth DM. 2003. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res*,2: 410-417.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decodier I i Kirsch-Volders M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88:1515-1531.

- McDiarmind M, Oliver MS, Roth TS, *et al.* 2010. Chromosome 5 and 7 abnormalities in oncology personnel handling anticancer drugs. *JOEM*, 52: 1028-1034.
- McHale CM, Zhang L i Smith MT. 2012. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis*, 33(2):240-252.
- Meo SA, Al-Drees AM, Rasheed S, Meo IM, Al-Saadi MM, Ghani HA i Alkandari JR. 2009. Health complaints among subjects involved in oil cleanup operations during oil spillage from a Greek tanker Tasman Spirit. *Int J Occup Med Environ Health*, 22:143-148.
- Mitelman F. 1994. Chromosomes, genes and cancer. *CA Cancer J Clin*, 44: 133-135.
- Miyamae Y, Iwaski K, Kinane N, Tsuda S, Murakama M, Tanaka M i Sasaki YF. 1997. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (comet) assay II. Relationship between DNA migration and alkaline conditions. *Mutat Res*. 393: 107-113.
- Monyarch G. 2010. Estudi genotòxic en limfòcits dels pescadors exposats al fuel abocat pel petrolier Prestige. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Monyarch G, de Castro Reis F, Zock JP, Giraldo J, *et al.* 2013. Chromosomal bands particularly affected by acute oil exposure and DNA repair and errors. *PLoS Genetics*, *submitted*.
- Morales-Caselles C, Kalman J, Micaelo C, Ferreira AM, Vale C, Riba I, DelValls TA. 2008. Sediment contamination, bioavailability and toxicity of sediments affected by an acute oil spill: four years after the sinking of the tanker Prestige (2002). *Chemosphere*, 71: 1207-1213.
- Moreno R, Jover L, Diez C i Sanpera C. 2011. Seabird feathers as monitors of the levels and persistence of heavy metal pollution after the *Prestige* oil spill. *Environ Pollution*, 159: 2454-2460.
- Morita A, Kusak Y, Deguchi Y, Moriudhi A, Nakanaga Y, Iki M, Miyazaki S i Kawahara K. 1999. Acute health problems among the people engaged in the cleanup of the Nakhodka oil spill. *Environ Res*, 81:185-194.
- Mrasek K, Schoder C, Teichmann AC, Behr K, Franze B, *et al.* Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int J Onc*, 36: 929-940.
- Mullenders L, Atkinson M, Paretzde H, Sabatier L i Bouffler S. 2009. Assessing cancer risk of low-dose radiation. *Perspectives*, 9: 596-606.
- Musak L, Vodicka P, Klimentova G, *et al.* 2006. Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. *Scand J Work Environ Health*, 10: 71-74.
- N**
- Nakagome Y, Matsubara T, Fujita H. 1983 Distribution of break points in human structural rearrangements. *Am J Hum Genet*. 35:288-300.
- Natarajan AT i Obe G. 1978. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. Part I. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mutat Res*, 52: 137-149.
- Natarajan AT i Palitti F. 2008. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research*, 657: 3-7.
- Navasumrit P, Arayasiri M, Hiang OM, Leechawengwongs M, Promvijit J, Choonvisase S, *et al.* 2008. Potential health effects of exposure to carcinogenic compounds in incense smoke in temple workers. *Chem Biol Interact*, 173: 19-31.
- Norppa H. 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149: 309-334.

Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, *et al.* 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*, 600: 37-45.

O

Obe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Goedeck W, *et al.*, 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res*, 504: 17-36.

O'Connor SR, Farmer PB i Lauder I. 1999. Benzene and Non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*, 189:448-453.

Osofsky HJ, Osofsky JD i Hansel TC. 2011. Deepwater horizon oil spill: mental health effects on residents in heavily affected areas. *Disaster Med Public Health Prep*, 5:280-286.

P

Painter RB. 1980. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat Res*, 70: 337-341.

Palakodeti A, Lucas I, Jiang Y, Young DJ, Fernald AA, Karrison T i Le Beau MM. 2010. Impaired replication dynamics at the FRA3B common fragile site. *Hum Mol Genetics*, 19: 99-110.

Palinkas LA, Russell J, Downs MA i Petterson JS. 1992. Ethnic differences in stress, coping, and depressive symptoms after the Exxon Valdez oil spill. *J Nerv Ment Dis*, 180:287-295

Palinkas LA, Petterson JS, Russell J i Downs MA. 1993. Community patterns of psychiatric disorders after Exxon Valdez oil spill. *Am J Psychiatry*, 150:1517-1523.

Palinkas LA, Petterson JS, Russell JC i Downs MA. 2004. Ethnic differences in symptoms of post-traumatic stress after the Exxon Valdez oil spill. *Prehosp Disaster Med*, 19:102-112.

Pandey AK, Bajpayee M, Parmar D, Kumar R, Rastogi SK, *et al.* 2008. Multipronged evaluation of genotoxicity in indian petrol-pump workers. *Environ Mol Mutagen*, 49:695-707.

Papachristou F, Simopoulou M, Touloupidis S, Tsalikidis C, Sofikitis N i Lialiaris T. 2008. DNA damage and chromosomal aberrations in various types of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 90: 1774-1781.

Pardo B, Gómez-González A i Aguilera A. DNA double-strand break repair. How to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 66: 1039-1056.

Paz-y-Miño C, López-Cortés A, Arévalo M i Sánchez ME. 2008. Monitoring of DNA damage in individuals exposed to petroleum hydrocarbons in Ecuador. *Ann NY Acad Sci*, 1140:121-128.

Pérez-Cadahía B, Laffon B, Pásaro E i Méndez J. 2004. Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled *Prestige* crude oil. *Comp Bioch & Phys*, 138: 453-460.

Pérez-Cadahía B, Laffon B, Pásaro E i Méndez Josefina. 2006. Genetic damage induced by accidental environmental pollutants. *Sci World J*, 6: 1221-1237.

Pérez-Cadahía B, Lafuente A, Cabaleiro T, Pasaro E, Méndez J, Laffon B. 2007. Initial study on the effects of *Prestige* oil on human health. *Environ Int*, 33:176-185.

Pérez-Cadahía B, Laffon B, Porta M, Lafuente A, Cabaleiro T, López T, Caride A, Pumarega J, Romero A, Pasaro E i Méndez J. 2008a. Relationship between blood concentrations of heavy metals and cytogenetic and endocrine parameters among subjects involved in cleaning coastal areas affected by the *Prestige* tanker oil spill. *Chemosphere*, 71:447-455.

- Pérez-Cadahía B, Laffon B, Valdiglesias V, Pásaro E i Méndez J. 2008b. Cytogenetic effects induced by Prestige oil on human populations: the role of polymorphisms in genes involved in metabolism and DNA repair. *Mutat Res*, 653:117-123.
- Pérez-Cadahía B, Méndez J, Pásaro E, Lafuente A, Cabaleiro T i Laffon B. 2008c. Biomonitoring of human exposure to Prestige oil: effects on DNA and endocrine parameters. *Environ Health Insights*, 2:83-92.
- Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Pavlova S, Petkova V, Hirvonen A, Creus A, Norppa H i Marcos Ricard. 2002. Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environ Health Perspect*, 110: 399-404.
- Porfirio B, Tedeschi B, Vernole P, Caporossi D, Nicoletti B. The distribution of MspI-induced breaks in human lymphocyte chromosomes and its relationship to common fragile sites. *Mutat Res*, 213: 117-124.
- Q**
- Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, *et al.* 1994. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai. *Cancer Epidemiol.* 3: 3-10.
- R**
- Rappaport SM, Kim S, Thomas R, Johnson BA, Bois FY i Kupper LL. 2013. Low-dose metabolism of benzene in humans: science and obfuscation. *Carcinogenesis*, 34:2-9.
- Rearson S. 2011. Ten months after Deepwater Horizon, picking up the remnants of health data. *Science*, 331:1252.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T i Leiros I. 2009. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and the short of it. *Cell Mol Life Sci*, 66: 981-999.
- Rodríguez-Trigo G, Zock JP i Montes I. 2007. Health effects of exposure to oil spills. *Arch Bronconeumo*, 43:628-635.
- Rodríguez-Trigo G, Gómez FP, Monyarch G, Bouso L, Coll MD, Vereá H, Anto JM, Fuster C i Barberà JA. 2010. Health changes in fishermen 2 years after clean-up of the Prestige oil spill. *Ann Intern Med*, 153:489-499.
- Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J i Mayan O. 2006. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research*, 604:19-27.
- Rosin MP i German J. 1985. Evidence for chromosomal instability in vivo in Bloom syndrome: Increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. *Hum Genet*, 71: 187-191.
- Rossner P, Bofetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D i Srám RJ. 2005. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Persp*, 113: 517-520.
- S**
- Sabucedo JM, Arce C, Senra C, Seoane G i Vázquez I. 2010. Symptomatic profile and health related quality of life of persons affected by the Prestige catastrophe. *Disasters*, 34:809-820.
- Sasiadek M, Jagielski J i Smolik R. 1989. Localization of breakpoints in the karyotype of workers professionally exposed to benzene. *Mutat Res*, 224: 235-240.
- Sato T, Sakamoto T, Takita K, Saito H, Okui K i Nadamura Y. 1993. The human prohibitin (PHB) gene family and its somatic mutations in human tumors. *Genomics*, 17: 762-764.
- Schmidt CW. 2011. Study to examine health effects in Deepwater Horizon oil spill cleanup workers. *Environ Health Perspect*, 119(5):A204.

- Schnatter R, Armstrong TW, Nicolich MJ, Thompson FS, Katz AM, *et al.* Lymphohaematopoietic malignancies and quantitative estimates of exposure to benzene in Canadian petroleum distribution workers. *Occup Environ Med*, 53:773-781.
- Schnatter AR, Glass DC, Tang G, Irons RD i Rushton L. 2012. Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis. *J Natl Cancer Inst*, 104: 1724-1737.
- Schwartz M, Zlotorynski E i Kerem B. 2006. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters*, 232: 13-26.
- Selzer E i Hebar A. 2012. Basic principles of molecular effects of irradiation. *Wien Med Wochenschr*, 162/3-4:47-54.
- Shaffer LG i Lupski JR. 2000. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34: 297-329.
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, *et al.* 2005. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet*, 77: 78-88.
- Shimizu Y, Nakatsuru Y i Ichinose M *et al.* 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:779-782.
- Sim MS, Jo IJ, i Song HG. 2010. Acute health problems related to the operation mounted to clean the Hebei Spirit oil spill in Taean, Korea. *Mar Pollut Bull*, 60:51-57.
- Smith MT, Zhang L, Wang Y, Hayes RB, Li G, *et al.* 1998a. Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Research*, 58:2176-2181.
- Smith MT i Zhang L. 1998b. Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model. *Environ Health Perspect*, 106:937-946.
- Smith MT. 2010. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Annu Rev Public Health*, 31: 133-148.
- Snyder R. 2012. Leukemia and benzene. *Int J Environ Res Public Health*, 9: 2875-2893.
- Sommerfelt MA, Williams BP, Clapham PR, Solomon E, Goodfellow PN i Weiss RA. 1988. Human T cell leukemia viruses use a receptor determined by human chromosome 17. *Science*, 242: 1557-1559.
- Speit G i Hartmann A. 1999. The comet assay (single cell gel test) - A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protoc*, 113: 203-212.
- Speit G i Schütz P. 2008. The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutat Res*, 655: 22-27.
- Speit G, Leibiger C, Kuehner S i Högel J. 2013. Further investigations on the modified comet assay for measuring aphidicolin-block nucleotide excision repair. *Mutagenesis*, 28: 145-151.
- Sprent J i Tough DF. 1994. Lymphocyte life-span and memory. *Science*, 265: 1395-1400.
- Stallings RL. 2007. Are chromosomal imbalances important in cancer? *Trends in Genetics*, 23: 278-283.
- Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, *et al.* 2005. A common inversion under selection in Europeans. *Nature Genetics*, 37: 129-137.
- Stillman WS, Varella-Garcia M i Irons RD. 2000. The benzene metabolite, hydroquinone, selectively induces 5q31 - and - 7 in human CD34+CD19- bone marrow cells. *Experimental Hematology*, 28: 169-176.

- Stimpson KM, Matheny JE i Sullivan BA. 2012. Dicentric chromosomes: unique models to study centromere function and inactivation. *Chromosome Res*, 20: 595-605.
- Studer RA, Dessailly BH i Orengo CA. 2013. Residue mutations and their impact on protein structure and function: detecting beneficial and pathogenic changes. *Biochem J*, 449: 581-594.
- Suárez B, Lope V, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Rodríguez-Artalejo F, Marqués F, Guzmán A, Vilorio LJ, Carrasco JM, Martín-Moreno JM, *et al.* 2005. Acute health problems among subjects involved in the cleanup operation following the Prestige oil spill in Asturias and Cantabria (Spain). *Environ Res*, 99:413-424.
- Surrallés J, Autio K, Nylund L, Järventaus H, Norppa H, *et al.* Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis*, 18:817-823.
- Suspiro A i Prista J. 2011. Biomarkers of occupational exposure to anticancer agents: A mini review. *Toxicology Letters*, 207: 42-52.
- Sutandyo N. 2010. Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med*, 42: 36-42.
- T**
- Tannenbaum SR, Skipper PL, Wishnok JS, Stillwell WG, Day BW i Taghizadeh K. 1993. Characterisation of various classes of protein adducts. *Environ Health Perspect*, 99: 51-56.
- Tawn EJ. Chromosome changes in human cancer- are they pointers to mechanisms of initiation? *Radiat Oncol Invest*, 5: 97-102.
- Tawn EJ i Whitehouse CA. 2001. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *Mutat Res*, 490: 171-177.
- Tedeschi B, Porfirio B, Caporossi D, Vernole P, Nicoletti B. 1991. Structural chromosomal rearrangements in HpaII-treated human lymphocytes. *Mutat Res*, 248: 115-121.
- Tedeschi B, Cicchetti R, Argentin G, Caporossi D, Pittaluga M, Parisi P, Vernole P. 2004. Aphidicolin and bleomycin induced chromosome damage as biomarker of mutagen sensitivity: a twin study. *Mutat Res*, 546: 55-64.
- Testa A, Festa F, Ranaldi R, Giachelia M, Tirindelli D, De Marco A, Owczarek M, Guidotti M i Cozzi R. 2005. A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environ & Mol Mut*, 46: 182-188.
- Thoma CR, Toso A, Meraldi P i Krek W. 2011. Mechanisms of aneuploidy and its suppression by tumour suppressor proteins. *Swiss Med Wkly*, 141:w13170.
- Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei MB, Chenard MP, Lidereau R, Basset P i Rio MC. 1995. Identification of four novel human genes amplified and over expressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics*, 28: 367-376.
- Tompa A, Jakab MG i Major J. 2005. Risk management among benzene-exposed oil refinery workers. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 208:509-516.
- Tompa A, Jakab M, Biró A, *et al.* 2006. Chemical safety and health conditions among Hungarian hospital nurses. *Ann NY Acad Sci*, 1076: 635-648.
- Törnqvist M i Ehrenberg L. On cancer risk estimation of urban air pollution. *Environ Health Perspect*, 102: 173-181.
- Tovalín H, Valverde M, Morandi MT, Blanco S, Whitehead L i Rojas E. 2006. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. *Occup Environ Med*, 63: 230-236.

Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR i Carrano AV. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutat Res*, 297: 337-341.

Tunca BT i Egeli U. 1996. Cytogenetic findings on shoe workers exposed long-term to benzene. *Environ Health Perspect*, 104:1313-1317.

U

Uren AG, Kool J, Berns A i van Lohuizen M. 2005. Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future. *Oncogene* 24: 7656-7672.

V

Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, Amor-Carro Ó, Mariñas-Pardo L, Ramos-Barbón D, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. 2012. In vivo genotoxicity assessment in rats exposed to Prestige-like oil by inhalation. *J Toxicol Environ Health A*, 75:756-64.

Vande Loock K, Decodier I, Ciardelli R, Haumont D i Kirsch-Volders M. 2012. An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity. *Mutagenesis*, 25: 25-32.

Van Hemel JO i Eussen HJ. 2000. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Human Genet*, 107: 415-432.

Vaz F, Hanenberg H, Scuter B, Barker K, Wiek C, Erven V, *et al.* 2010. Mutation of the RAD51C gene in Fanconi anemia like disorder. *Nature Genetics*, 42: 406-411.

Velando A, Munilla I, López-Alonso M, Freire J i Pérez C. 2010. EROD activity and stable isotopes in seabirds to disentangle marine food web contamination after the Prestige oil spill. *Environ Pollution*, xxx: 1-6.

Vlaanderen J, Lan Q, Kromhout H, Rothman N i Vermeulen R. Occupational benzene exposure and the risk of lymphoma subtypes: a meta-analysis of cohort studies incorporating three study quality dimensions. *Environ Health Perspect*, 119: 159-167.

W

Wang B, Hurov K, Hofmann K i Elledge SJ. 2009. NBA1, a new player in the Brca1 a complex is required for recombination hotspots. *Genetics*, 189: 685-94.

Wang L, He X, Bi Y i Ma Q. 2012. Stem cell and benzene-induced malignancy and hematotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 25: 1303-1315.

Weinstock DM, Brunet E i Jasin M. 2007. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol*, 9:978-81.

Wijnhoven SWP, Kool HMJ i van Oostrom CTM *et al.* 2000. The relationship between benzo[a]pyrene-induced mutagenesis and carcinogenesis in repair-deficient Cockayne syndrome group B mice. *Cancer Res*, 60:5681-5687.

X

Xing C, Marchetti F, Li G, Weldon RH, Kurtovich E, Young S, *et al.* 2010. Benzene exposure near the U.S. permissible limit is associated with sperm aneuploidy. *Environ Health Perspect*, 118: 833-839.

Xue W i Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206: 73-93.

Y

Yager JW, Hines CJ i Spear RC. 1983. Exposure to ethylene oxide at work increases sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. *Science*, 219: 1221-1223.

Z

- Zhang H, Peng C, Hu Y, Li H, Sheng Z, Chen Y, *et al.* 2012. The BLK pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet*, 44: 861-871.
- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Bechtold W, *et al.* 1996. Interphase cytogenetics of workers exposed to benzene. *Environ Health Perspect*, 104:1325-1329.
- Zhang L, Wang Y, Shang N i Smith MT. 1998a. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletions of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Res*, 22: 105-113.
- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Li G, *et al.* 1998b. Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene. *Carcinogenesis*, 19:1955-1961.
- Zhang L, Eastmond D i Smith MT. 2002. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Crit Rev in Toxicol*, 32: 1-42.
- Zhang L, McHale CM, Rothman N, Li G, Ji Z, Vermeulen R, *et al.* 2010. Systems biology of human benzene exposure. *Chemico-Biological Interact*, 184: 86-93.
- Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J Bem-Porat N, Ozeri E, *et al.* 2003. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 7143-7151.
- Zock JP, Rodríguez-Trigo G, Pozo F, Barberá JA, Bouso L, Torralba Y, Anto JM, Gómez ZP, Fuster C i Verera H. 2007. Prolonged respiratory symptoms in clean-up workers of the Prestige oil spill. *Am J Respir Crit Care Med*, 176:610-616.
- Zock JP, Rodríguez-Trigo G, Rodríguez-Rodríguez E, Espinosa A, Pozo-Rodríguez F, Gómez F, Fuster C, Castaño-Vinyals G, Antó JM i Barberá JA. 2012. Persistent respiratory symptoms in clean-up workers 5 years after the Prestige oil spill. *Occup Environ Med*, 69:508-513.