



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DAÑO LIPOPEROXIDATIVO, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y
FRAGILIDAD OSMÓTICA DE GLÓBULOS ROJOS EN TRABAJADORES DE
ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE
CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

XIORIMAR JOSEFINA SUNIAGA FIGUERAS

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2018

DAÑO LIPOPEROXIDATIVO, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y
FRAGILIDAD OSMÓTICA DE GLÓBULOS ROJOS EN TRABAJADORES DE
ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE
CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

Prof. Edgar Zapata Vívenes
Asesor

Prof (a). Luz Marina Rojas

Prof (a). Patricia Velázquez

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	6
Muestra poblacional	6
Criterio de exclusión.....	6
Normas de bioética	6
Obtención de la muestra	7
Parámetros hematológicos	7
Hemoglobina	7
Hematocrito	8
Contaje de glóbulos rojos	8
Parámetros bioquímicos	8
Ácido tiobarbitúrico (TBARS)	9
Análisis enzimáticos.....	9
Catalasa.....	10
Glutación-S-transferasa	10
Glutación reducido	10
Proteínas.....	11
Fragilidad osmótica	11
Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	29
HOJAS DE METADATOS	46

DEDICATORIA

A

Mi Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, sobre todo por bendecirme con salud y mucha tolerancia para lograr esta meta.

Mami, Angélica Figueras, gracias por tu confianza, paciencia, consejos, por estar siempre allí motivándome y dándome fuerzas para no decaer, no hay palabras para agradecerte, este logro es para tí.

Papá, Martin Suniaga, a pesar de tu distancia, este logro también te pertenece, para que te sientas orgulloso, porque también aportaste tu granito de arena para el comienzo de mi carrera.

Mi viejita, Josefina, lo que tanto me pediste lo logré, gracias por tus consejos, regañitos, y tenerme siempre presente en tus oraciones, gracias por creer en mí.

Mi hermana, Xiorangel Suniaga, a pesar de las indiferencias siempre has estado apoyándome y deseando lo mejor para mi, se que este logro también te hará sentir orgullosa.

Mi sobrino, Keiber Rondón, este logro también es tuyo mi gordo, por ser tú gran parte en mi vida.

A ti, vida de mi vida, Roberto Moreno, gracias por estar presente, no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor, por estar en las buenas y las malas, por la paciencia, por ser mi compañero, este logro lo comparto contigo. Te Amo Amor.

A mi manitica, Anairubis Bello, por todo el apoyo brindado, gracias por siempre estar, excelente amiga.

Amigas y comadre, Mayerling González, Rosangeles Rondón, gracias por su amistad y apoyo incondicional.

Abigail Rodríguez y a la familia Moreno León, gracias por todos los consejos, por darme siempre ese empujoncito, su apoyo, su ayuda y confiar en mi. Si, lo logré, mucho que agradecerles.

AGRADECIMIENTO

A

El profesor Edgar Zapata, por ser mi co-asesor, por todo el apoyo brindado, por su tiempo, tolerancia, amistad y conocimientos que me transmitió.

La profesora Sonia Nusetti, por ser mi asesora, por su confianza, amistad, cariño, y sobre todo por la oportunidad brindada para el desarrollo de esta tesis.

La Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por ser gran parte en mi recorrido de vida, grandes experiencias, orgullosa de haber formado parte de la casa más alta, a cada profesor que también forman parte de ella y me brindaron conocimientos en este gran recorrido.

Todas aquellas personas por su solidaridad, buena fé y confianza.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de hemólisis a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, e individuos controles.	18
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de hemoglobina (g/dl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. ...	13
Figura 2. Valores de Hematocrito (%) en trabajadores de estaciones de servicio en TES de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.....	13
Figura 3. Contaje de glóbulos rojos ($\times 10^6$ GR/ μ l) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. ...	14
Figura 4. Concentración de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en glóbulos rojos (μ mol/g Hb) de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. * Significa $p < 0,05$	15
Figura 5. Concentración de glutatión (GSH) en glóbulos rojos (μ mol/g Hb) de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.....	15
Figura 6. Contenido de proteínas totales (g/dl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. ...	16
Figura 7. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en glóbulos rojos (μ mol/ml) de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.	16
Figura 8. Actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) en glóbulos rojos de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. El asterisco (*) representa $p < 0,05$	17
Figura 9. Porcentaje de hemólisis a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná, estado Sucre (cuadros) e individuos controles (triángulos). No significativo (NS) representa $p > 0,05$	18

RESUMEN

Los trabajadores encargados de dispensar combustibles en las estaciones de servicios se encuentran expuestos constantemente a compuestos orgánicos volátiles (COVs) provenientes de los combustibles. En este orden se procedió a evaluar el daño lipoperoxidativo, algunas defensas antioxidantes y la fragilidad osmótica en glóbulos rojos de individuos trabajadores en gasolineras en la ciudad de Cumaná (El Trebol, Nueva Toledo, Santa Rosa de Lima, San Luis, Venezuela y Virgen del Valle), estado Sucre. Se seleccionaron una suma de 30 trabajadores (aparentemente sanos) de estaciones de servicio (TES), con edades comprendidas entre 25 y 45 años, en comparación a un grupo considerado control (N=30). A cada uno de los individuos se les tomó muestras de sangre venosa, con la cual se determinó los parámetros hematológicos: hemoglobina (Hb), porcentaje de hematocrito (%Hto) y conteo de glóbulos rojos (GR); también se se cuantificó los niveles de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión reducido (GSH), proteínas totales, la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST). Adicionalmente se estimó la fragilidad osmótica de los GR. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las variables hematológicas, niveles de GSH, CAT, proteínas plasmáticas y fragilidad osmótica entre los dos grupos evaluados. Los TES presentaron los promedios más elevados de TBARS y GST en comparación al grupo control. Los resultados muestran señales de una condición de estrés oxidativo en eritrocitos de los TES, fundamentado en un incrementado daño oxidativo y actividad de GST. Tales hallazgos posiblemente sean consecuencia de la inhalación continua de COVs proveniente de su ámbito laboral. Los parámetros determinados pueden ser aplicados como índices de estrés y de exposición laboral a COVs.

INTRODUCCIÓN

Los trabajadores encargados de dispensar combustibles en las estaciones de servicios, o bombas gasolineras, se encuentran expuestos constantemente a una serie de compuestos orgánicos volátiles (COVs) liberados por la gasolina y gasoil. Los compuestos contentivos en tales combustibles incluyen hidrocarburos alifáticos, cíclicos y no cíclicos, aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), entre otros, que pueden ser nocivos para la salud (Caro *et al.*, 2009; INSHT, 2017).

Las intoxicaciones por COVs tienen, de manera general, un origen involuntario, ya sea en el ámbito laboral, ambiental o doméstico (Caro *et al.*, 2009). En las estaciones de servicios, la exposición de los trabajadores a COVs se produce en tres ocasiones; en primer lugar, en la operación de rellenado de tanques que abastecen a los surtidores desde las cisternas de transporte; la segunda ocasión es, al varillar tanques para determinar el volumen de los mismos o comprobar el correcto funcionamiento de la sonda de medición automática en los casos en que se disponga, y la tercera exposición ocurre, al suministrar gasolina a los tanques de los vehículos de usuarios, constituyendo así una constante exposición a los vapores tóxicos (Rosell *et al.*, 2011).

La vía de contaminación con los COVs es producida por inhalación de sus vapores (respiratoria), o contacto con la piel (cutáneo) (Caro *et al.*, 2009). Dependiendo del tiempo de exposición, las personas pueden sufrir de diversos síntomas tales como irritación en los ojos y vías respiratorias, dolor de cabeza, mareos, apatía, trastornos visuales, fatiga, náuseas, trastornos de memoria, entre otros; mientras que a largo plazo pueden causar efectos cancerígenos, infertilidad, daño a la médula ósea, lesiones de hígado, pulmones, riñones y sistema nervioso central (Caro *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2017).

Las exposiciones continuas a COVs y su posterior absorción en el organismo desencadenan un conjunto de reacciones químicas de óxido-reducción relacionadas con el metabolismo de los xenobióticos, que a su vez

generan especies reactivas de oxígeno (EROs) (Abdrabouh *et al.*, 2017). Dichas especies de radicales libres constituyen un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno, entre ellas se encuentran el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), entre otros. Estas EROs son generadas por las células en condiciones aerobias durante la reducción del oxígeno molecular por reacciones enzimáticas y auto-oxidación de diversas sustancias (Quitamar y Calderon, 2009).

Los mecanismos de óxido-reducción a nivel celular, especialmente en el hígado, inicia con la participación del citocromo $\text{P}_{450}\text{IIE1}$ (presente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos). En este ciclo se generan radicales electrofílicos que reaccionan con enzimas y proteínas estructurales, conduciendo a diversas alteraciones moleculares (Santiago *et al.*, 2002; Ulusoy *et al.*, 2007; Bokolo y Ligha, 2013). El citocromo $\text{P}_{450}\text{IIE1}$ también produce metabolitos reactivos que se ligan mediante uniones covalentes al tripéptido glutatión (GSH) y a macromoléculas intracelulares (Fernández y Orono, 2001; Pérez *et al.*, 2006).

El metabolismo redox intracelular de los COVs en los trabajadores de las estaciones de servicios puede provocar una sobreproducción de EROs, y una merma en el sistema de defensas antioxidantes (Muhammad *et al.*, 2014). Esta condición es denominada estrés oxidativo (EO), la cual da lugar a cambios estructurales y funcionales en las biomoléculas, lípidos, proteínas y ADN de las células conduciendo a la muerte celular, desarrollo de enfermedades degenerativas o carcinogénesis (Ríos, 2003; Calenic *et al.*, 2015; Insa, 2015).

La oxidación de lípidos y proteínas puede provocar cambios estructurales en la hemoglobina y ocasionar alteraciones profundas en la organización estructural y funciones de la membrana eritrocitaria, incluyendo un incremento de la permeabilidad de la misma, que puede provocar la ruptura de la membrana de los eritrocitos alterando su fragilidad osmótica (hemólisis) (Nagababu y Rifkind, 2000; Ostrea *et al.*, 2008). Además, estas alteraciones

estructurales en el glóbulo rojo disminuye la capacidad de transporte y difusión del oxígeno hacia los tejidos y predispone la aparición de anemias en los individuos (Torres, 2011).

El EO puede afectar a todos los sistemas celulares y tejidos. Para defenderse de esta condición oxidativa, las células cuentan con un poderoso sistema de defensa antioxidante enzimático conformado por superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), y no enzimáticos como los grupos tiol de proteínas, vitaminas (C y E) y minerales (zinc y magnesio) (Zamora, 2007; Mayor, 2010).

Los glóbulos rojos son una fuente particularmente rica en catalasa (CAT). Esta enzima se encuentra en el ser humano con alta concentración en el hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, y prácticamente nula en tejido nervioso. Se localiza a nivel celular en las mitocondrias, excepto en los eritrocitos donde se encuentra en el citosol. La enzima, en su aporte al mantenimiento del balance oxidante/antioxidante se encarga de la destrucción del H_2O_2 u otros peróxidos orgánicos que se producen en el metabolismo de xenobióticos (Díaz, 2002; Grijota, 2015).

La GST es una enzima importante por presentar diversidad en su actividad, participa en los procesos metabólicos y enzimáticos. La misma puede catalizar la conjugación, con el tripéptido gamma-glutamilcisteinilglicina o glutatión (GSH), a través de su grupo tiol, de compuestos endógenos formados durante los procesos de degradación oxidativa. Por su capacidad de atacar moléculas nucleofílicas, también conjugan el tripéptido a través de su grupo tiol con compuestos electrofílicos exógenos (Towsend *et al.*, 2003; Denzoin *et al.*, 2013), reduciendo su reactividad y facilitando su eliminación de la célula a través de miembros de la familia de proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (Castillo *et al.*, 2007; Ramírez y Arizmendi, 2012; Martínez, 2014). Se ha informado que algunos mecanismos de resistencia a tóxicos se asocian con incrementos en la actividad de esta enzima. Esta determinación es

usada en la industria para sondear la exposición de trabajadores a compuestos con riesgo de toxicidad (Tejedor, 2010).

Las moléculas que poseen grupos tioles (-SH) juegan un papel importante en la defensa contra las EROs. Estos grupos funcionales están presentes en proteínas y péptidos como el GSH; su determinación ha sido utilizada como un marcador de contaminación en distintos sistemas biológicos (Ferreira y Mastsubara, 2000; Cárdenas y Pedraza, 2006; Prakash *et al.*, 2009). Una deficiencia de -SH predispone a la célula a sufrir de daños oxidativos, debido a la transformación a componentes disulfuros, lo que puede favorecer la aparición de un rango amplio de patologías (Schewedhelm *et al.*, 2003; Cárdenas y Pedraza, 2006; Valko *et al.*, 2016).

Los glóbulos rojos solo pueden cumplir sus funciones durante aproximadamente 120 días. Esto requiere ATP y equivalentes redox, que deben regenerarse permanentemente mediante el metabolismo energético y redox (Grijota, 2015). Estas vías son necesarias para mantener la forma bicóncava de las células, sus concentraciones específicas de cationes intracelulares, el estado reducido de hemoglobina con un hierro divalente y los grupos sulfhidrido de enzimas, glutatión y componentes de membrana. Si ocurre una deficiencia enzimática de una de estas vías metabólicas se limita la producción de ATP y/o NADPH y se producen alteraciones claras de la membrana que provocan la eliminación de las células dañadas por el sistema monocito-macrófago. Una deficiencia hereditaria del GSH puede causar anemia hemolítica no esferocítica (Winterbourn, 1985; Fitzpatrick *et al.*, 2012).

Diversos autores han evidenciado alteración de marcadores de estrés oxidativo en individuos expuestos a COVs (Xiong *et al.*, 2016). A este respecto se ha demostrado que las concentraciones de COVs en el aire alveolar de trabajadores de estaciones de servicios de gasolina aumentan directamente con los años de permanencia del individuo en el ambiente laboral, absorbiéndose en mayor proporción el benceno y sus derivados, los cuales están asociados a daños en las macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN en glóbulos

blancos y aberraciones cromosómicas (Ortiz, 2011). Además, se ha demostrado alteración en los sistemas de defensa antioxidantes, denotándose una disminución en los niveles de GSH y una activación de enzimas del metabolismo de xenobióticos y EROs, tales como citocromo P₄₅₀, glutatióna-S-transferasa, SOD y CAT en sangre de trabajadores de gasolineras, incluso en diversos tejidos, tales como el hígado, riñón, pulmón y cerebro de animales experimentales (Cárdenas *et al.*, 2012).

En estudios recientes se ha demostrado que los glóbulos blancos de trabajadores en gasolineras presentaron daños significativos en el ADN, siendo estas lesiones reducidas por la administración de antioxidantes (Ortiz, 2011). Al parecer, los trabajadores encargados de manipular y dispensar combustibles en las estaciones de servicios no cuentan con medidas de control para evitar la exposición a tales contaminantes, creando expectativas sobre algunos cambios en la fisiología sanguínea.

A nivel local existe poca información sobre la contaminación de individuos trabajadores en gasolineras, los mismos están expuestos, diariamente, a contaminantes de alto riesgo que pudieran conllevar al desarrollo de patologías moleculares y degenerativas. La utilización de marcadores celulares y moleculares permite evidenciar cambios en el organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. En este sentido, se evaluaron parámetros hematológicos, niveles de lípidos peroxidados, algunas defensas (enzimáticas y no enzimáticas) antioxidantes y la fragilidad eritrocitaria en trabajadores en gasolineras de la ciudad de Cumaná.

METODOLOGÍA

Muestra poblacional

La muestra poblacional de interés estuvo conformada por 30 trabajadores de estaciones de servicio de gasolina (TES), constituidas por 2 de género femenino y 28 de género masculino. Todos los individuos fueron adultos, con edades comprendidas entre 25 y 45 años. Los TES presentaron entre un (1) a cinco (5) años trabajando en estaciones de servicios (gasolineras) en la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Las estaciones de servicio visitadas fueron: El Trebol, Nueva Toledo, Santa Rosa de Lima, San Luis, Venezuela y Virgen del Valle.

En contraste, se comparó con un grupo de individuos considerado control, constituido por 30 personas sin exposición comprobada a COVs; siendo 7 de género femenino y 23 de género masculino. A cada uno de los participantes se le aplicó una encuesta de datos clínicos epidemiológicos para conocer sus antecedentes médicos y laborales (Anexo 1).

Criterio de exclusión

Se excluyeron del presente trabajo los individuos fumadores y los que padecen de diabetes, hipertensión y/o hiperlipemia; así como también, consumidores de bebidas alcohólicas o con tratamientos antioxidantes durante el estudio.

Normas de bioética

Este trabajo se realizó cumpliendo con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, establecidos en la 18^{va} Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio de 1964, y con posteriores enmiendas (Asociación Médica Mundial, 2017). De acuerdo a ello, este estudio estuvo solo a cargo de personas con debida preparación científica y bajo vigilancia de profesionales de la salud, se respetó los derechos de cada individuo participante en la investigación a salvaguardar su integridad personal y se aplicaron todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad, integridad física y mental de los sujetos. También, enmarcados dentro de estos

lineamientos, a cada paciente se le entregó por escrito las indicaciones necesarias para la toma de la muestra sanguínea y se le informó de la importancia, objetivo del estudio, métodos y procedimientos a utilizar en la investigación (Anexo 2).

Obtención de la muestra

Este procedimiento se realizó a nivel de la vena cubital media, previa asepsia de la región del pliegue del codo, por punción venosa. En el mismo, se extrajeron 8 ml de sangre con jeringas estériles descartables, de los cuales, 5 ml fueron transferidos a tubos de ensayos estériles con una gota (50 μ l) del anticoagulante sal disódica del ácido etilendiamino-tetracético disódico ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) al 10%, y 3 ml se colocaron en tubos de ensayos secos y estériles. Todas estas muestras se mantuvieron refrigeradas hasta llegar al laboratorio.

Una vez allí, se tomó 1 ml del espécimen con anticoagulante para la determinación de hemoglobina, conteo de glóbulos rojos (GR), hematocrito y fragilidad globular, y el resto fue centrifugado a 3 000 g durante 10 minutos. El plasma así obtenido y la capa de blancos se descartaron y el paquete eritrocitario fue lavado tres veces con buffer fosfato salino (PBS) 0,16 mol/l NaH_2PO_4 , 0,12 mol/l Na_2HPO_4 , 0,15 mol/l NaCl y pH 7,40, para ser utilizado en la determinación del ácido tiobarbitúrico (TBARS), las enzimas catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), y glutatión (GSH) (De la Paz *et al.*, 1996). Las muestras de sangre total (3 ml), servidas en tubos sin anticoagulantes, fueron centrifugadas para la obtención del suero a partir del cual se midieron los valores de proteínas totales.

Parámetros hematológicos

Hemoglobina

Para la determinación de este parámetro, se empleó un analizador hematológico automatizado (Medonic M16S/M20S). La cantidad de muestra aspirada por el analizador, fue mezclada con cierta cantidad de lisante, el cual contiene cianuro; la hemoglobina fue medida por un método colorimétrico donde ésta es oxidada por ferrocianuro de potasio (K_3FeCN_6) a metahemoglobina, que reacciona con el cianuro de potasio (KCN) para formar cianometahemoglobina.

La luz monocromática, que pasa a través de la muestra, fue medida por un fotosensor a 525 nm. La medición de la absorbancia fue directamente proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra. Se utilizó un patrón de referencia de concentración 13,40 mg/dl y controles: control anormal bajo 6,50 mg/dl, control anormal alto 18,50 mg/dl y control normal 13,40 mg/dl. Los valores de referencia en hombres: 14,00-18,00 g/dl y en mujeres: 12,00-16,00 g/dl (Boule Medical AB, 2014).

Hematocrito

El analizador hematológico automatizado (Medonic M16S/M20S) calculó el porcentaje del hematocrito empleando los valores del conteo de células rojas (RBC), y del volumen corpuscular medio (MCV) de cada muestra, a través de la siguiente fórmula: $HTC \% = RBC \times MCV / 100$. Los valores de referencia oscilan en hombres: 40,00-54,00% y en mujeres: 37,00-47,00% (Boule Medical AB, 2014).

Contaje de glóbulos rojos

Para el contaje de glóbulos rojos, el analizador automático (Medonic M16S/M20S), midió los cambios en una resistencia eléctrica producida por una partícula, en este caso representada por la célula roja, dicha partícula fue suspendida en un diluyente conductivo que pasa a través de una abertura de dimensiones conocidas, generando impulsos eléctricos; el número de pulsos eléctricos generó señales que equivalen al número de células rojas que pasarán a través de la abertura, en este sentido, la amplitud de cada pulso eléctrico es proporcional al volumen de cada glóbulo rojo. Los valores de referencia para hombres se encuentran entre 4,70 a 6,10 $\times 10^6$ GR/ μ l y en mujeres entre 4,20 a 5,40 $\times 10^6$ GR/ μ l (Boule Medical AB, 2014).

Parámetros bioquímicos

El paquete eritrocitario de cada muestra fue congelado a -20°C y luego descongelados a 37°C para causar la hemólisis. El hemolizado fue utilizado para cuantificar TBARS, GSH, CAT y GST (De la Paz *et al.*, 1996).

Sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La cuantificación de la peroxidación lipídica se realizó empleando la técnica fotocolorimétrica para la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que mide los niveles de malonaldehído (MDA) como uno de los productos principales del proceso. Se tomaron 200 µl de la muestra hemolizada en 2 ml de solución salina al 0,9% y luego se centrifugaron a 2 200 g por 15 minutos. Se tomaron 250 µl del sobrenadante del homogenizado de GR, los cuales se colocaron en tubos de ensayos. Las muestras y los tubos de la curva patrón se incubaron en baño de agua a 37°C con agitación constante durante 15 minutos. Seguidamente, los tubos se colocaron en baño de hielo y se le adicionaron 250 µl de solución cromógena contentiva de ácido tricloroacético al 13% y ácido clorhídrico 1 mmol/l para detener la reacción, adicionalmente, se agregaron 500 µl de TBARS al 1% (Wasowicz *et al.*, 1993; Gresner *et al.*, 2016).

Los tubos se colocaron en un baño de agua a 90°C con agitación constante por 10 minutos. Luego fueron enfriados nuevamente en baño de hielo por 10 minutos. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 1 500 g por 10 min a 4°C en una centrifuga refrigerada Sordall RC2-B, los sobrenadantes fueron transferidos a la celda de espectrofotómetro para medir la absorbancia de las muestras, a una longitud de onda de 532 nm, contra un blanco constituido por todos los reactivos, a excepción de la muestra. La concentración de malondialdehído (MDA) se calculó mediante el uso de una curva patrón de MDA estandar y los valores se expresaron en µmol/g hemoglobina (Hong *et al.*, 2000).

Análisis enzimáticos

La actividad de las enzimas antioxidantes se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a 25 ± 1°C. Los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado en un volumen final de 1 ml. Las estimaciones de pendiente y actividad enzimática específica se realizaron en el programa UV Winlab Lambda 25 bajo ambiente Windows.

Catalasa

La actividad enzimática se determinó por el descenso de la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una longitud de onda de 240 nm (Coeficiente de extinción= 40 mol/l). La mezcla de incubación estuvo constituida por un buffer fosfato KH_2PO_4/K_2PO_4 50 mmol/l a pH 7,50 y H_2O_2 50 mmol/l. A la cubeta experimental de cuarzo, se agregó 800 μ l de buffer fosfato y 50 μ l del extracto enzimático. Se mezcló rápidamente y se midió el cambio de absorbancia por 3 minutos. Se dió inicio a la reacción adicionando 150 μ l de H_2O_2 (Rauchoca *et al.*, 2005).

Glutación-S-transferasa

La actividad de esta enzima se cuantificó siguiendo el ascenso en la concentración del complejo formado por la glutatona reducida (GSH) y 1-cloro 2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de extinción molar= 9,60 mmol/l). La mezcla de incubación consistió en Na_2HPO_4 100 mmol/l pH 6,50, CDNB 2,50 mmol/l disuelto en etanol y glutatión reducida (GSH) 67 mmol/l. En la cubeta experimental, se agregaron 900 μ l de buffer de incubación, 20 μ l de CDNB y 30 μ l de extracto enzimático (Pompella *et al.*, 2003).

Glutatión reducido

Para determinar el glutatión (GSH) se aplicó la metodología Oxy Research GSH-400, el cual se basa en una reacción química colorimétrica que procede en dos pasos. El primero conduce a la formación de productos de sustitución (tioéteres) entre un reactivo patentado, R1 (4-metilsulfato de cloro-1-metil-7-triflurometil-quinolin), y todos los mercaptanos (RSH) que están presentes en la muestra. El segundo paso es una reacción de eliminación que tiene lugar en condiciones alcalinas. La reacción está mediada por el reactivo R2 (30,00% NaOH) que transforma específicamente la sustitución producto (tioéter) obtenido con GSH en una tiona cromofórica que tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 400 nm.

Antes del ensayo, se preparó una curva estándar con al menos cinco

concentraciones de GSH. Estas cinco concentraciones cubrieron el rango de 20-100 $\mu\text{mol/l}$ en el medio de reacción (cubeta espectrofotométrica). Se preparó una solución de trabajo de ácido metafosfórico (MPA), disolviendo 5 g de MPA en 100 ml de agua. Se elaboró una solución estándar de trabajo GSH 0,5 mmol/l disolviendo GSH en solución de MPA.

Antes de cada serie de mediciones se ajustó la absorbancia del espectrofotómetro a cero a 400 nm, solo con tampón (solución 3). Se realizaron tres mediciones independientes de la absorbancia en blanco (A_0) a 400 nm. El valor de A_0 se restará de los valores de absorbancia obtenidos con la muestra (A). Los espacios en blanco deben medirse una vez solo después de 10 minutos de incubación. Para cada medición, la mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: se tomó una muestra de volumen inicial (V_i) (20-300 μl). Se llevó a un volumen final de 900 μl con buffer (volumen de solución 3 = 900 μl - V_i). Se agregó 50 μl de solución R1 y mezcló bien. Luego, se agregó 50 μl de solución R2 y mezcló bien. Se incubó a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 10 minutos en la oscuridad. La absorbancia final (A) se midió a 400 nm (Anderson, 1989).

Proteínas

En esta determinación se aplicó el método colorimétrico Biuret, en el cual la proteína presente en la muestra reacciona con el cobre bivalente, presente en una solución alcalina, para formar un compuesto purpúreo conocido como el complejo de Biuret (complejo Cu-proteína), siendo la intensidad cromática del complejo, directamente proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra, la cual se midió espectrofotométricamente a 540 nm. Se tomaron como valores de referencia entre 6,40-8,30 g/dl (Burtis *et al.*, 2005).

Fragilidad osmótica

Con la fracción de glóbulos rojos se realizó la fragilidad osmótica. Para ello, se preparó una solución amortiguadora de fosfato con NaCl al 1,00%, a partir de la cual se realizaron soluciones acuosas al 0,90; 0,70; 0,60; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30 y 0,10% NaCl, a pH 7,40. En 10 tubos se colocaron 5 ml de cada solución anterior y se les adicionaron 20 μl de la suspensión eritrocitaria, se

mezclaron y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, los tubos fueron centrifugados a 640 g por 10 minutos, se tomaron los sobrenadantes para determinar las absorbancias (Abs) en un espectrofotómetro a 540 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó comparándolo con la solución 0,10% (que corresponde al 100% de hemólisis). El porcentaje de hemólisis se estimó mediante la fórmula: % hemólisis= absorbancia tubo X x 100/absorbancia tubo 0,10% NaCl. En individuos aparentemente sanos y sin alteraciones en la membrana de los eritrocitos, la hemólisis se produce entre 0,45% y 0,35% de NaCl (Korones y Pearson, 1989; Alonso *et al.*, 2015).

Análisis estadístico

Los resultados se muestran en figuras y tablas. A los datos obtenidos se les aplicó la prueba estadística varianza simple (ANOVA), con el propósito de determinar posibles diferencias significativas entre los promedios de las variables hematológicas y bioquímicas determinadas en el grupo experimental y control. Además, se empleó el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis con el propósito de determinar posibles diferencias significativas entre las medianas de los grupos experimentales en relación a la fragilidad osmótica de glóbulos rojos en el grupo de trabajadores de estaciones de servicio con respecto a los controles (Sokal y Rohlf, 1980).

RESULTADOS

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los parámetros hematológicos determinados en trabajadores de estaciones de servicio (TES) e individuos controles, entre los cuales se cuentan los promedios de la concentración de Hb (g/dl), Hto (%) y GR ($\times 10^6$ GR/ μ l).

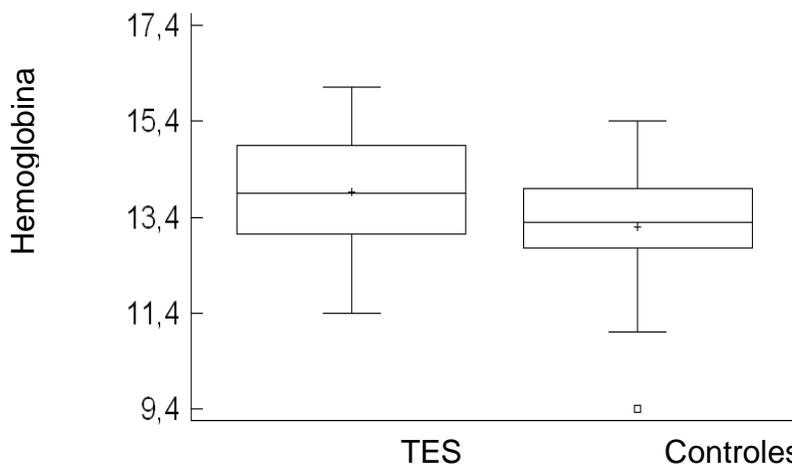


Figura 1. Concentración de hemoglobina (g/dl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.

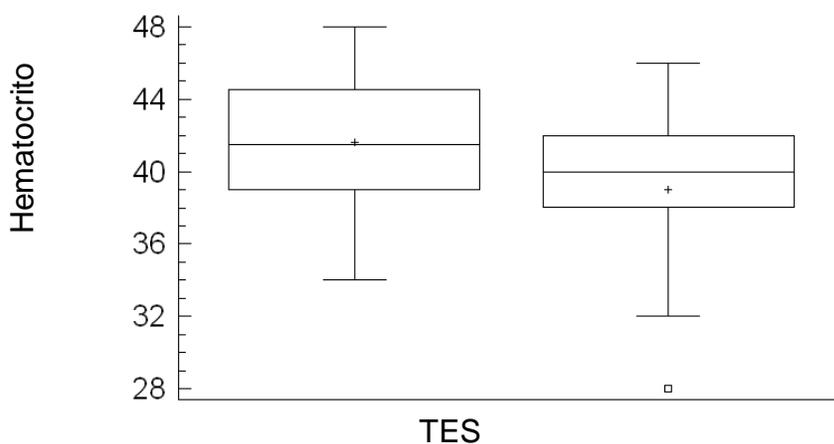


Figura 2. Valores de Hematocrito (%) en trabajadores de estaciones de servicio en TES de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.

Los mayores los promedios fueron hallados en los TES (\bar{x} =13,91 g/dl; \bar{x} =41,60% y \bar{x} =4,59 $\times 10^6$ GR/ μ l, respectivamente) en comparación a los controles (\bar{x} =13,18 g/dl; \bar{x} =39,80%; \bar{x} =4,33 $\times 10^6$ GR/ μ l, respectivamente). Sin

embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los mismos ($F_{SHb}=2,95$; $F_{SHto}=3,06$ y $F_{SGR}=2,68$; $p>0,05$ para todas los análisis).

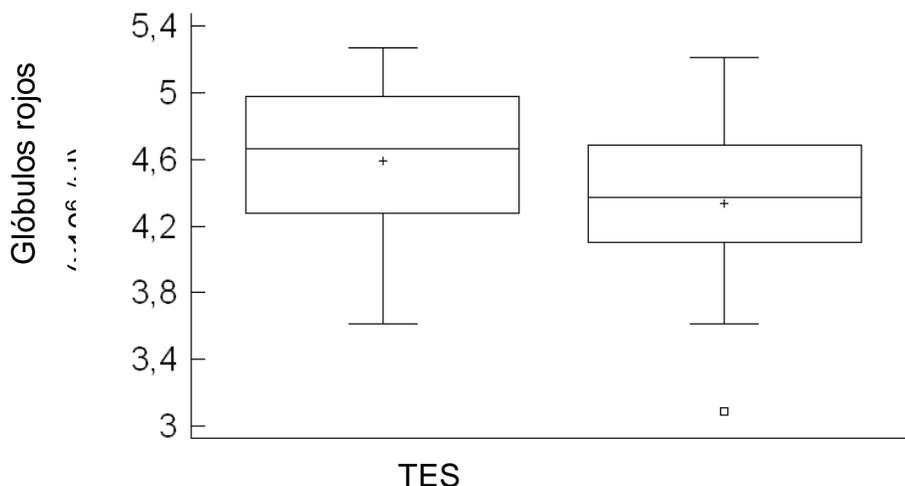


Figura 3. Contaje de glóbulos rojos ($\times 10^6$ GR/ μ l) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.

Al comparar el valor promedio de la concentración de las sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBARS) relacionada con el contenido de Hb en TES con respecto al grupo control (Figura 4), se encontró una diferencia estadística muy significativa ($F_s=35,31$; $p<0,05$), observándose más elevado en los trabajadores frecuentemente expuestos a la inhalación de los vapores de combustibles ($\bar{x}=7,25$ μ mol/g Hb) que en los individuos controles ($\bar{x}=3,25$ μ mol/g Hb).

En la figura 5 se muestran los valores promedios de la concentración de glutatión (GSH) (μ mol/g Hb), determinados en TES e individuos controles. Los mismos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($F_s=1,28$; $p>0,05$), siendo el promedio de este tripéptido menor en los TES ($\bar{x}=0,14$ μ mol/g Hb) que en los individuos controles ($\bar{x}=0,15$ μ mol/g Hb).

Los promedios de las proteínas totales (g/dl) en los dos grupos en estudio se muestra en la figura 6, donde los mismos se observaron más bajos en los TES ($\bar{x}=7,27$ g/dl) que en los individuos controles ($\bar{x}=7,81$ g/dl); no obstante, la diferencia fue estadísticamente no significativa ($F_s=0,32$; $p>0,05$ Ns).

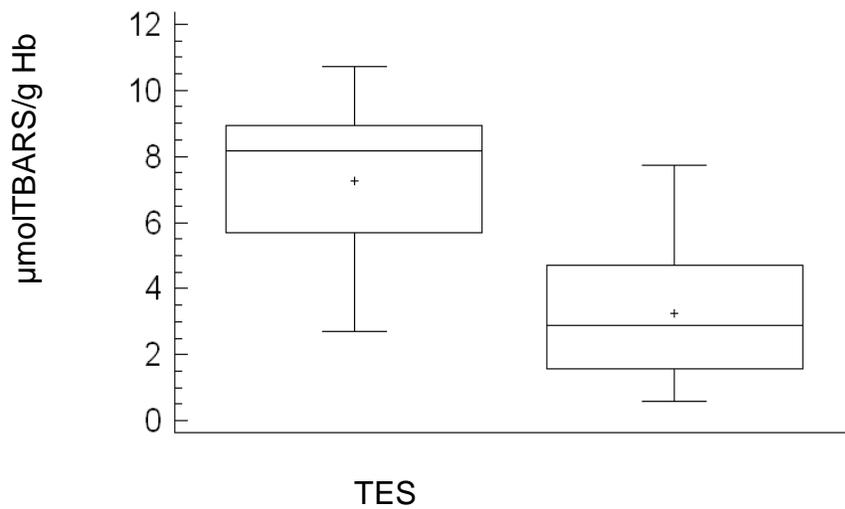


Figura 4. Concentración de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en glóbulos rojos ($\mu\text{mol/g Hb}$) de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. * Significa $p < 0,05$.

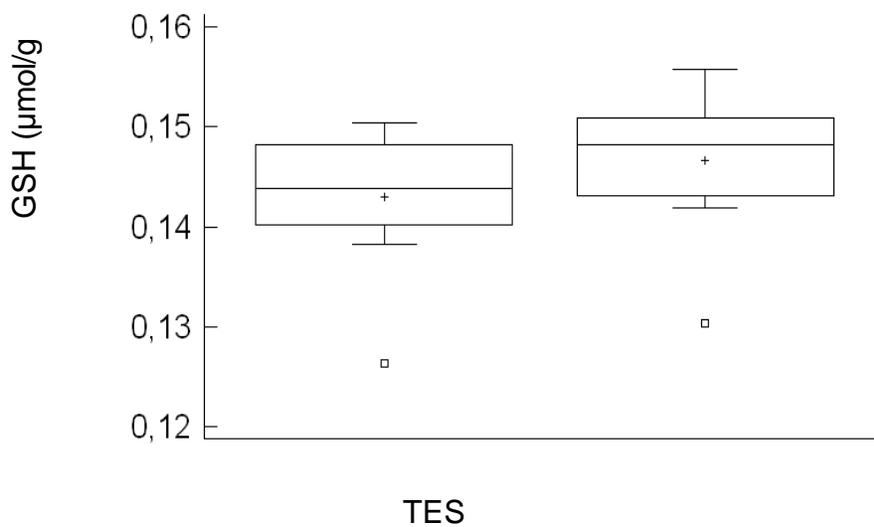


Figura 5. Concentración de glutatión (GSH) en glóbulos rojos ($\mu\text{mol/g Hb}$) de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.

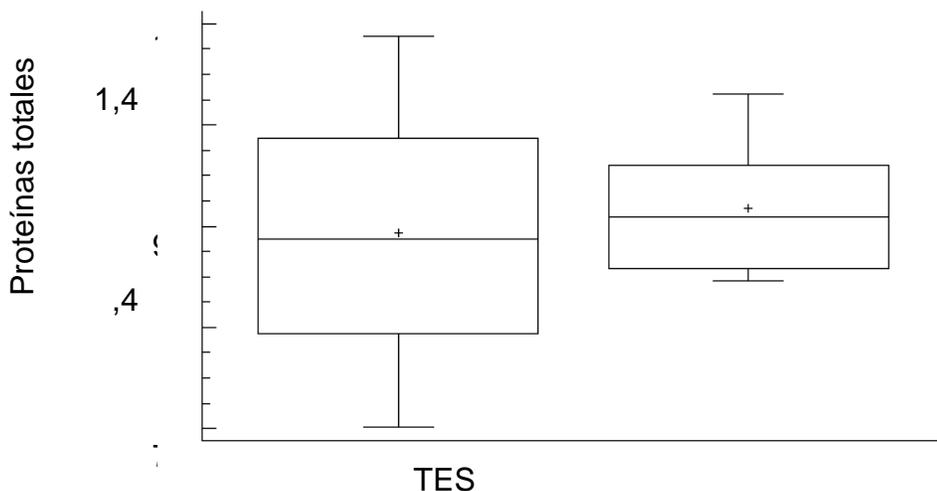


Figura 6. Contenido de proteínas totales (g/dl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.

En la figura 7 se muestran los promedios de la actividad de la enzima catalasa (CAT) determinados en TES e individuos controles. Los mismos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($F_s=1,25$; $p>0,05$), aunque la actividad mayor en los bomberos ($\bar{x}=3,05$ U) que en los individuos controles ($\bar{x}=2,55$ U).

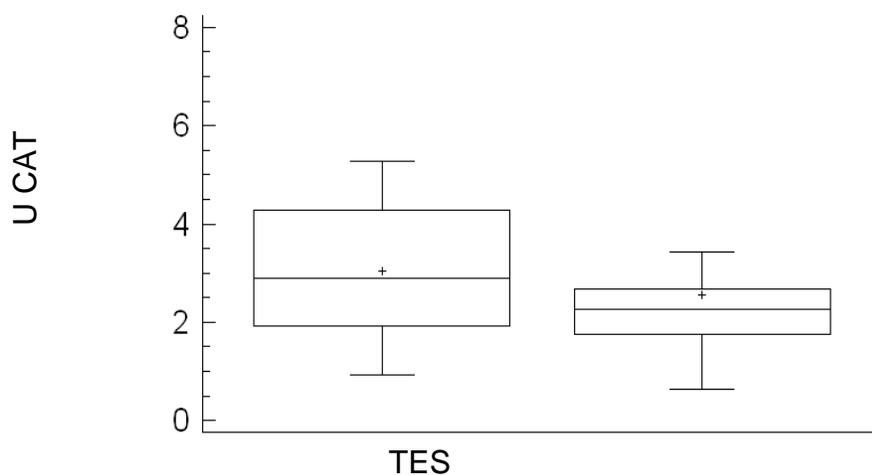


Figura 7. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en glóbulos rojos ($\mu\text{mol/ml}$) de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles.

En cuanto a la actividad de la enzima glutatona-S-transferasa (GST) se observó una diferencia estadística altamente significativa ($F_s=18,55$; $p<0,05$) entre los

valores de TES respecto a los individuos controles, encontrándose un valor más alto ($\bar{x}=0,822$ U) en el grupo ocupacional que en el grupo de referencia ($\bar{x}=0,205$ U) (Figura 8).

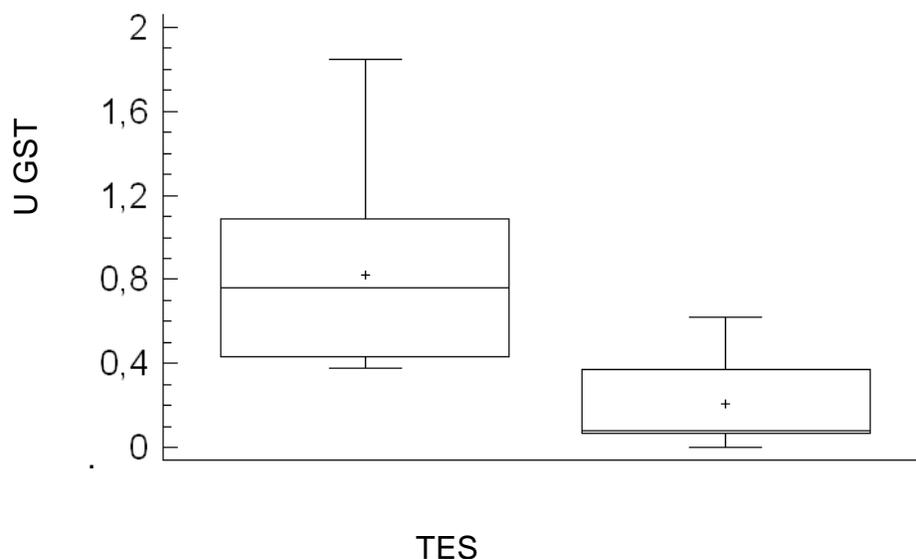


Figura 8. Actividad de la enzima glutatióna-S-transferasa (GST) en glóbulos rojos de trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná versus individuos controles. El asterisco (*) representa $p < 0,05$.

Los porcentajes (%) de hemólisis de glóbulos rojos determinados en los TES con respecto al grupo control se muestran en la figura 9. En la misma se puede observar que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los promedios de esa variable evaluada en ambas muestras poblacionales.

En la tabla 1, se presenta que la resistencia globular mínima (inicio de la hemólisis) de los glóbulos rojos de TES se presentó a concentraciones de 0,50% de NaCl (% hemólisis= $6,12 \pm 2,20$ TES; $12,82 \pm 10,00$ grupo control), ocurriendo un comportamiento similar para la concentración 0,40% NaCl; mientras que, la resistencia globular máxima (hemólisis completa de los eritrocitos) se produjo a una concentración de 0,30% ($88,00 \pm 15,00\%$ TES; $85,90 \pm 20,00\%$ grupo control).

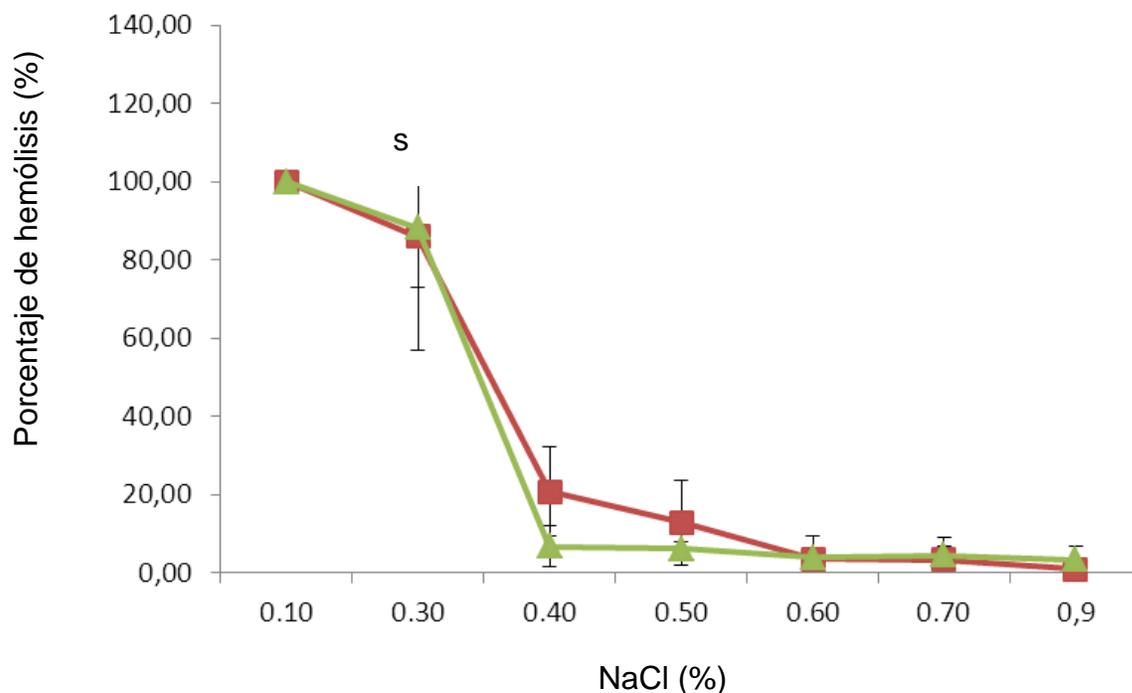


Figura 9. Porcentaje de hemólisis a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná, estado Sucre (cuadros) e individuos controles (triángulos). No significativo (NS) representa $p > 0,05$.

Tabla 1. Porcentajes de hemólisis a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) en trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, e individuos controles.

[NaCl]	% Hemólisis		P
	Sanos $\bar{X} \pm DS$	TES $\bar{X} \pm DS$	
0,30%	85,90 ± 20,00	88,00 ± 15,00	>0,05 Ns
0,40%	20,80 ± 11,10	6,80 ± 5,30	
0,50%	12,82 ± 10,00	6,12 ± 2,20	

NaCl=cloruro de sodio; \bar{X} : media; DS: desviación estándar, Ns: diferencias no significativas.

DISCUSIÓN

Los parámetros hematológicos determinados (Hb, Hto y GR) en TES no mostraron alteraciones, permaneciendo sus promedios dentro de los valores de referencia, lo que permite descartar enfermedades hematológicas (OMS, 2011). Estos resultados guardan relación con los encontrados por Haro-García *et al.* (2012), los cuales no evidenciaron cambios en los componentes citohemáticos en los trabajadores que manipulaban combustibles, cuya antigüedad en el sitio de trabajo fue menor a los 55 meses; la cual ha sido señalada como el lapso de exposición ocupacional, al menos a la fracción bencénica.

Es importante destacar que el tiempo de exposición es un factor importante para evidenciar cambios en los parámetros sanguíneos. Según Abdrabouh *et al.* (2017) en un estudio realizado en trabajadores de estaciones de servicios de la localidad de Mansoura City (Egipto) encontró una reducción significativa en los niveles de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular, y en el conteo total y diferencial de las células blancas. El incremento en el tiempo de exposición a los COVs hace mayor la concentración de sus metabolitos de tolueno (ácido hipúrico), xileno, y el ácido o-metilhipúrico en orina, y por ende mayor, aumenta la posibilidad de desarrollar patologías (Santiago *et al.*, 2017).

Se conoce que el riesgo de exposición a combustibles derivados del petróleo, tales como la gasolina, se relaciona principalmente a cuatro compuestos orgánicos principales: benceno, tolueno, etileno y xileno, que en conjunto son conocidos como BTEX (Abubakar *et al.*, 2015). Sin embargo, el benceno ha sido considerado el componente más riesgoso, debido a su potencialidad mutagénica y a los efectos carcinogénicos que provocan sus metabolitos (Odewabi *et al.*, 2014). Palma *et al.* (2015) han establecido proporcionalidad entre la duración de la exposición a los hidrocarburos y el producto de excreción en orina.

En cuanto al tolueno, un hidrocarburo aromático, aunque no lo ha considerado genotóxico ni cancerígeno en humanos y animales por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se ha reportado que en dosis bajas, durante largo tiempo, puede producir daños hematológicos (Shih *et al.*, 2011; Castellano, 2013).

En otros estudios se ha señalado que las exposiciones a gasolina afecta a todos los sistemas celulares y tejidos, inclusive a los glóbulos rojos, generando cambios hematológicos leves con presencia de macrocitosis e hipocromía, disminución en su capacidad de transporte y difusión del oxígeno hacia los tejidos, fragilidad globular, poiquilocitosis y anemias (D`Andrea y Kesava, 2014; Abozer *et al.*, 2015; Chávez y Poveda, 2016). Sobre esta situación se ha explicado que, los metabolitos finales de la gasolina son los responsables de los efectos perjudiciales en la médula ósea, en la cual provoca cambios estructurales de todos los componentes celulares, además de la capacidad anaplásica, leucemiogénica y hemolítica (Torres, 2011; Haro-García *et al.*, 2012; Villegas, 2015).

Con respecto al xileno, se ha informado que existe controversia sobre su efecto hematotóxico cuando se absorbe por inhalación (Haro-García *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha planteado que la exposición a isómeros de xileno lleva a la formación de productos tóxicos intermedios y finales semejantes a los del benceno, con efectos perjudiciales en la médula (Caro *et al.*, 2009). Asimismo, se ha sostenido que el daño hematológico causado por estos hidrocarburos podría potenciarse al encontrarse en forma de mezcla (tolueno, xileno y benceno), como lo observado por Haro-García *et al.* (2012), quien encontró cambios en algunos parámetros hemáticos de trabajadores de una fábrica de pintura en México.

Los leucocitos de los individuos expuestos a COVs presentaron mayor fragmentación del ADN en comparación a los controles. Cuando los glóbulos blancos de estos individuos fueron expuestos *in vitro* a un agente pro-oxidante, el ADN exhibió una alta sensibilidad al efecto tóxico de la sustancia estresante,

en comparación a los controles. La oxidación del ADN tiene potenciales consecuencias genotóxicas y está implicada en la patogénesis de varias enfermedades, incluido el cáncer y los trastornos neurodegenerativos (Gérin *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2005; Marlatt *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010).

En relación a los marcadores de estrés oxidativo en este estudio, se pudo detectar alteraciones en los niveles de TBARS y glutathione S transferase, pero no así en la actividad de CAT, lo que permite evidenciar una condición de estrés oxidativo y es clara señal que se encuentran activados los mecanismos de desintoxicación de xenobioticos a nivel sanguíneo en los TES. Esta situación que podría tener como fuente principal la inhalación de los compuestos presentes en los referidos combustibles (Calenic *et al.*, 2015; Forman *et al.*, 2009).

El aumento en los niveles de TBARS en los TES estaría indicando un importante aumento de la oxidación de moléculas lipídicas en los trabajadores evaluados. El daño oxidativo a esta macromolécula se debe a la acción directa de compuestos como el benceno, tolueno y xileno, o a la sobreproducción de EROs a través del metabolismo de los xenobióticos en los organismos. La activación del citocromo P-450 produce de forma indirecta EROs tal como $\cdot\text{OH}$, el cual es reconocido como desencadenante de la lipoperoxidación, al reaccionar con componentes celulares subyacentes como los lípidos de las membranas (Téllez *et al.*, 2006; Carranza, 2011; Calenic *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Gresner *et al.* (2016), en mujeres expuestas a COVs por el oficio de técnicas de uñas, encontraron un aumento significativo en la concentración de TBARS y de las defensas antioxidantes (GPX y SOD) en ese grupo ocupacional. Además, en una investigación realizada en China por Xia *et al.* (2017) demostraron un incremento significativo del MDA en un grupo de TES con respecto a un grupo control, concluyendo que la exposición a la gasolina puede provocar un aumento del estrés oxidativo entre los asistentes ocupacionales.

En consecuencia, se puede presumir que los TES evaluados en este estudio se encuentran en riesgo de presentar diversas patologías; pues, se conoce que varios productos finales de la peroxidación de lípidos son tóxicos, con un potencial mutágeno y carcinogénico probado, tales son los casos del 4-hidroxi-2-nonenal, del cual se ha informado que tiene potencial mutagénico, mientras que el MDA puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana, provocando que las propiedades de ésta resulten aún más alteradas. Es así como, se ha establecido que la peroxidación de lípidos está íntimamente conectada con el desarrollo de una amplia gama de procesos patológicos y fisiológicos como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, inflamación y envejecimiento (Martínez, 1998; Boberis *et al.*, 2000; Quitamar y Calderon, 2009). Esta amplia variedad de patologías ocurre por disminución de sus defensas inmunes, que se ven afectadas al incrementar la oxidación de las mismas (Caro *et al.*, 2008).

El aumento de la actividad de la GST eritrocitarias en el grupo de TES con respecto al control señala que los individuos se encuentran metabolizando y desintoxicando xenobióticos orgánicos e incluso EROs (Forman *et al.*, 2009), que se pueden estar formando como producto de la inhalación de los COVs presentes en el combustible manipulado en el ambiente de trabajo. Se conoce que la actividad del sistema antioxidante puede aumentar o inhibirse bajo una condición de estrés químico (Winston y Di Giulio, 1991), jugando un rol crucial en el mantenimiento del estado de óxido-reducción de las células. La inducción de las enzimas puede aumentar la tolerancia del organismo a un medio impactado por agentes prooxidantes (Muller *et al.*, 2007).

El ingreso (A TRAVÉS DE QUE) y posterior biotransformación enzimática de los constituyentes orgánicos probablemente genera un aumento considerable de EROs, tales como: el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. Esta biotransformación es llevada a cabo por medio de los sistemas monoxigenasa citocromo-P₄₅₀ (Santiago *et al.*, 2002) y la GST (Newman, 2015). El aumento en la generación de óxidoradicales produce daños

biológicos variados entre los que se incluyen; peroxidación de lípidos, daños a ácidos nucleicos, inactivación enzimática y degradación de proteínas. En respuesta al incremento en la formación de radicales libres la actividad de las enzimas antioxidantes también pueden incrementarse. La magnitud de los efectos perjudiciales de las EROs es dependiente de la efectividad de las defensas antioxidantes (Di Guiseppi *et al.*, 2008; Córdova *et al.*, 2010).

A pesar de no encontrar diferencias en la actividad de CAT, se ha sugerido que su incremento refleja la capacidad de respuesta rápida ante la presencia de oxidoradicales. La CAT es una proteína homotetramérica que contiene grupos hémicos. Esta enzima está asociada principalmente a los peroxisomas y cierta actividad se encuentra en el citosol (Rahman, 2007; Mahmood *et al.*, 2011). El incremento en los niveles de la misma sugiere que el organismo está bajo una situación de producción de peróxidos, especialmente H_2O_2 , asociado con el metabolismo oxidativo y biotransformación de las sustancias xenobioticas (Muhammad *et al.*, 2014). Al elevar la formación de H_2O_2 aumenta la actividad de CAT para convertir dicho sustrato en H_2O y O_2 .

Con respecto a la determinación de GSH en este estudio, no se encontraron alteraciones significativas entre los TES y el grupo control. El GSH es una molécula importantísima para eliminar EROs, así como de compuestos xenobióticos; de ahí su elevada concentración en el medio intracelular así como la abundancia de la enzima GST, la cual es crítica para la detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos (Forman *et al.*, 2009).

Los xenobióticos forman conjugados con GSH, ya sea de forma espontánea o enzimática a través de reacciones catalizadas por GST. Estos conjugados se excretan de la célula, formando un ácido mercaptúrico, que luego es excretado por el riñón. Si bien este proceso es importante para la desintoxicación del compuesto original, que a menudo es altamente reactivo, la conjugación de GSH también consume de manera irreversible GSH intracelular. En situaciones de estrés oxidativo la actividad peroxidasa la realizan las GSTs,

con aumento de esta actividad y disminución de la actividad transferasa (Aniya y Nieto, 1993; Lu, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2012).

El estrés oxidativo dentro de las células es controlado principalmente por acción del GSH. Esta molécula es ubicua con diversas funciones que incluyen desintoxicación, defensa antioxidante, mantenimiento del estado tiol y modulación de la proliferación celular. Se sintetiza en el citosol de todas las células de mamífero de una manera estrictamente regulada. Las cadenas laterales sulfhidrilo de los residuos de la cisteína de dos moléculas del GSH forman un enlace disulfuro (GSSG) durante el curso de ser oxidados en reacciones con varios óxidos y peróxidos en las células. El tiol de cisteína de GSH juega un papel de reducción-oxidación de los grupos tioles en otras proteínas. El estrés oxidativo también genera peróxidos que, a su vez, pueden ser reducidos por el GSH para generar agua y un alcohol, o 2 moléculas de aguas (Lu, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2012).

Mahmood *et al.* (2011) expresaron que la razón de las altas actividades enzimáticas de CAT y de otras enzimas antioxidantes (SOD) en un grupo de individuos trabajadores en gasolineras en la ciudad de Bagdad estuvo relacionada al metabolismo a través de algunos metabolitos como fenol y óxido de benceno. Los investigadores sugieren que SOD y CAT juegan un importante papel como antioxidante contra EROs generados durante el largo periodo de exposición al derivado de la gasolina y posteriormente, en el mantenimiento de la renovación celular en estos trabajadores.

En un estudio realizado por Owagboriaye *et al.* (2016) en ratas expuestas al humo de la gasolina demostraron un aumento en productos de peroxidación lipídica (MDA), y alteración en el GSH y en CAT. Estos autores sugieren que la peroxidación lipídica es uno de los mecanismos conocidos como productos de la generación de radicales libres en los sistemas biológicos y por tanto el humo de la gasolina genera un cuadro de estrés oxidativo agudo en la fisiología de las ratas expuestas sobrepasando su capacidad antioxidante.

El aumento de GST en el grupo de los TES sugiere la captación y

subsiguiente eliminación del xenobiótico orgánico. Esta enzima controla la toxicidad de metabolitos electrofílicos, derivados de la biotransformación de contaminantes orgánicos, generando sustancias menos tóxicas de fácil excreción, utilizando a la glutatona reducida (GSH) como cofactor. Este proceso enzimático forma parte de la fase II del mecanismo de biotransformación de compuestos orgánicos (Vibha y Umesh, 2015; Jaramillo y Valdivia, 2016). La GST también conjuga peróxidos orgánicos provenientes de la actividad del ciclo redox, asociado con la condición de estrés oxidativo, protegiendo las macromoléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente con dichas especies.

Distintas isoformas de GST han sido implicadas en la desintoxicación y biotransformación de muchos xenobióticos, incluidos varios carcinógenos y un número considerable de medicamentos (Hilal-Dandan y Brunton, 2013; Ahmed *et al.*, 2011). La conjugación incrementa la solubilidad del compuesto electrofílico, facilitando la excreción de la molécula del organismo. De esta manera, se ha informado que la referida enzima actúa conjugando al benceno, presente en la gasolina, para ser convertido en ácido prepercaptúrico o, en caso que la orina esté acidificada, en ácido mercaptúrico (Lauwerys, 1994; Camacho, 2014). En tal sentido, se señala la importancia de esta enzima como antioxidante en los individuos dispensadores de gasolina estudiados.

Ibrahim *et al.* (2011) explica que en ratas expuestas a un COV (benceno), se observó un aumento del MDA y una disminución de la actividad de las enzimas GSH-Px, CAT, superóxido dismutasa (SOD), así como de GSH en comparación con el grupo control. Al respecto informaron que, otros autores daban como explicación, a la disminución en la actividad de las enzimas GSH-Px, CAT y SOD, que se debe a una inactivación ocasionada por metabolitos del referido hidrocarburo y que la depleción de GSH es una de las consecuencias importantes de la lesión tóxica al hígado y establecieron el rol crítico de GSH para proteger los tejidos de los efectos tóxicos de la acumulación de

intermediarios reactivos (Eckert, 1988; Emara y El-Bahrawy, 2008). Además, señalaron que la CAT, entre otras enzimas antioxidantes, pueden proteger las membranas celulares contra el daño oxidativo causado por los radicales libres tóxicos y por lo tanto puede disminuir parcialmente ciertos tipos de degeneración celular del hígado.

Por su parte, Moro *et al.* (2013) informaron que, el benceno presente en la gasolina puede ocasionar estrés oxidativo en los TES, provocando daño genético y oxidación de proteínas, lo que induce un aumento de las defensas antioxidantes (GSH y actividad de GST) en respuesta al daño oxidativo generado por el combustible. Lo que se relaciona con los hallazgos de la presente investigación.

Los porcentajes de hemólisis de glóbulos rojos de TES con respecto al grupo control no mostraron alteraciones significativas a la integridad de las membranas globulares. Contrariamente, se ha señalado relación de la posible influencia del estrés oxidativo sobre la fragilidad osmótica (Gómez, 2012); posiblemente propiciado por la inhalación de los COVs provenientes de la gasolina. Estas evidencias constituyen un estado de alerta que señala la propensión de estos individuos al desarrollo de anemia, así como de patologías crónicas, autoinmunes o cancer.

Los riesgos inherentes a la manipulación de estas sustancias químicas, tampoco reciben capacitación relacionada con sus labores, ni seguridad industrial; lo cual contribuye a aumentar la probabilidad de producir efectos adversos sobre su salud. Por ello, la importancia de evaluar posibles marcadores de daños hematológicos y bioquímicos en los TES que permitan una detección temprana de procesos fisiopatológicos y un tratamiento oportuno para garantizar calidad de vida a estos individuos.

En tal sentido, resulta importante sugerir que son necesarias las medidas de bioseguridad en los expendios de gasolina. Por lo que, se recomienda el uso de elementos de protección personal (guantes, botas, mascarillas) en la población expuesta a los vapores del referido combustible, para evitar que estas

sustancias puedan penetrar fácilmente por vía inhalatoria y/o dérmica, y de esta manera evitar daños a la salud por la exposición reiterada a estas sustancias volátiles. Asimismo, se deben aplicar medidas de higiene, pues algunos de los trabajadores expuestos consumen alimentos y fuman en el sitio de trabajo, lo que incrementa la absorción de esas sustancias tóxicas (Palma *et al.*, 2015).

Los niveles de peroxidación lipídica encontrada y el aumento en la actividad de GST son claras señales de daño oxidativo en las membranas celulares y a su vez, indican incrementos en el metabolismo y posterior excreción, a nivel de hematíes, de los xenobióticos incorporados en la sangre e de trabajadores de gasolineras, posiblemente desde los vapores de los combustibles dispensados; tal exposición laboral puede conllevar a aumentar la fragilidad osmótica en tales trabajadores.

CONCLUSIONES

Los promedios de los parámetros hematológicos (Hb, hematocrito y conteo de GR) en individuos trabajadores en gasolineras se encontraron dentro de los valores de referencia.

La peroxidación lipídica (TBARS) se encontró significativamente incrementada en glóbulos rojos de trabajadores de gasolineras con respecto a los individuos aparentemente sanos, señalando daños a las membranas celulares.

Se observó incremento de las defensas desintoxicantes en glóbulos rojos de los trabajadores expuestos a vapores de gasolina, dado por un aumento en la actividad de glutatión-S-transferasa (GST). Mientras que, GSH y CAT no mostraron variaciones significativas.

Los glóbulos rojos de individuos trabajadores en gasolineras presentaron, frente a hipotonicidad del medio (0,30%), una fragilidad osmótica similar al grupo control.

RECOMENDACIONES

Continuar una línea de investigación que evalúe el desbalance de las reacciones oxido-reductivas en individuos expuestos a diferentes sustancias tóxicas, con el fin de determinar posibles causas de estas alteraciones y sus efectos, no sólo en eritrocitos, sino también, en el sistema de defensas inmunes y su implicación en el desarrollo de algunas enfermedades.

Se sugiere a los patronos de estaciones de servicios aportar a sus empleados todo el material y equipos de bioseguridad necesarios para la protección de la integridad física de los mismos; así como, se recomienda a los TES usar la indumentaria aportada y aplicar las medidas de higiene y seguridad necesarias durante la jornada de trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abozer, E.; Ahmed, M.; Nada, A.; Abeer, A.; Remah, E.; Romisa, A. y Nawal, E. 2015. Alterations in haematological parameters among workers of fuel stations in white Nile state, Sudán. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 6(11): 780-784.
- Abdrabouh, A. El-Wakf, A. Hagraas, A. y Elgharieb, A. 2017. Health assessment approach for evaluating hematologic and immune toxicity of prolonged gasoline inhalation in fuel station workers at Mansoura city, Egypt. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 7(8): 30-36.
- Abubakar, M.; Abdullah, W.; Sulaiman, S. y Ang, B. 2015. The effects of exposure to petrol vapours on growth, haematological parameters and oxidative markers in sprague-dawley male rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 22(1): 23-31.
- Ahmed, R.; Nahed, H.; Nagui, H.; Hoda, G. y Mabrouka, A. 2011. Gasoline inhalation induces perturbation in the rat lung antioxidant defense system and tissue structure. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1: 1-14.
- Alonso, Y.; Alonso-Moreno, Y.; Falcón-Diéguéz, J.; Lucambio-Miró, L. y Castro-Piñol, M. 2015. Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Revista Cubana de Química*, 27(2): 110-118.
- Alves, L.; Vieira, D.; Nunes, L.; Cruz, L.; Reis, A.; Gomes, I.; Luz, S.; Santos, A. y Esteves, M. 2017. Relationship between symptoms, use of PPE and habits related to occupational exposure to BTEX compounds in workers of gas stations in Bahia, Brazil. *Journal of Environmental Protection*, 8: 650-661.
- Anderson, M. 1989. Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione. In: *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. Dolphin, D.; Poulson, R. y Avramovic, O. (Eds.). Editorial. John Wiley and Sons. USA.

- Aniya, Y. y Nieto, A. 1993. Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione-S-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 45(1): 37-42.
- Asociación Médica Mundial. 2017. Declaración de Helsinki de la AMM. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. <<http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>> (10/05/2017).
- Boberis, A.; Costa, L. y Junqueira, V. 2000. Envejecimiento mitocondrial. *Revista Ciencia e Investigación*, 3(1): 1-4.
- Bokolo, B. y Ligha, A. 2013. Antioxidative effect of zinc on gasolina induced hepatotoxicity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(3): 43-52.
- Boule Medical AB. 2014. Manual de usuario Medonic M-series. Spånga, Suecia.
- Burtis, C.; Ashwood, E. y Bruns, D. (Eds). 2005. *Tietz, textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Fourth edition. WB Saunders Co. Philadelphia.
- Calenic, B.; Miricescu, D.; Greabu, M.; Kuznetsov, A.; Troppmair, J.; Ruzsanyi, V. y Amann, A. 2015. Oxidative stress and volatile organic compounds: interplay in pulmonary, cardio-vascular, digestive, tract systems and cancer. *Open Chemistry*, 13: 1020-1030.
- Camacho, A. 2014. Exposición infantil a hidrocarburos aromáticos policíclicos y benceno en sitios contaminados. Trabajo de Pregrado. Maestría en Ciencias Ambientales. Programas Multidisciplinarios en Ciencias Ambientales. Universidad de San Luis de Potosí. México.
- Cárdenas, A.; Tataje, L.; Florentini, E.; Peña, C. y Carranza, E. 2012. Oxidación de proteínas y lípidos en cerebro de cobayos durante la exposición a grandes alturas. *Ciencia e Investigación*, 15: 36-41.
- Cárdenas, N. y Pedraza, J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2): 164-173.

- Caro, M.; Gallejo, R. y Montero, R. 2008. Estado actual del control de la exposición a compuestos orgánicos volátiles en el medio laboral. *Seguridad y Salud en el Trabajo*, 46: 10-19.
- Caro, J.; Gallego, M. y Montero, R. 2009. Diferentes metodologías para la evaluación de riesgos originados por compuestos orgánicos volátiles en ambientes laborales. *Seguridad y Medio Ambiente*, 113: 20-36.
- Carranza, L. 2011. Cuantificación de micronúcleos en células de sangre periférica de mototaxistas que trabajan en la ciudad de Cartagena de indias. Trabajo de Investigación para optar al título de Magister en Toxicología. Departamento de Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Castellano, J. 2013. Tolueno y benceno tienen efectos nocivos sobre la salud y el medio ambiente. <http://www.ecologistasenaccion.org/article12818.html>.> (15/05/2017).
- Castillo, J.; Contreras, S.; Poblano, R.; Posadas, R. y Ramírez, J. 2007. Actividad en la enzima glutathion S-transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica*, 32: 138. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57609872>>_(28/03/2018).
- Chávez, D. y Poveda, A. 2016. Valoración del sistema inmune y hematológico en trabajadores expuestos a componentes de la gasolina en estaciones de servicio de combustible de la ciudad de Quito, 2016. Trabajo de Pregrado. Escuela de Bioanálisis. Pontificia Universidad Católica Del Ecuador.
- Córdova, A.; Saltijeral, J.; Ruiz, G.; Xolalpa, V.; Cortés, S.; Peña, S.; Córdova, C.; Córdova, M.; Méndez, M.; Huerta, R.; Juárez, M. y Guerra, J. 2010. Estrés oxidativo en gametos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(07): 1-32.
- Costa, C.; Pasquale, R.; Silvari, V. y Barbaro, S. 2005. Catania *in vitro* evaluation of oxidative damage from organic solvent vapors on human skin *Toxicology In Vitro*, 20: 324-331.

- D'Andrea, M. y Kesava, R. 2014. Hematological and hepatic alterations in nonsmoking residents exposed to benzene following a flaring incident at the British petroleum plant in Texas City. <<https://dx.doi.org/10.1186%2F1476-069X-13-115>> (20/12/2014).
- De la Paz, M.; Zhang, J. y Fridovich, I. 1996. Red blood cell antioxidant enzymes in age-related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*, 80: 445-450.
- Denzoin, L.; Soraci, A. y Tapia, M. 2013. Homeostasis del glutati3n. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3): 529-539.
- Di Guiseppi, J.; Fridovich, I. y McCord, J. 2008. The toxicity of molecular oxygen. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 12: 315-342. <<https://doi.org/10.3109/10.408448409044213>> (29/03/2018).
- Díaz, A. 2002. La estructura de las catalasas. *Current Science*, 22: 78-80.
- Eckert, G. 1988. The metabolism of aminophenols in erythrocytes. *Xenobiotica*, 18: 1319-1326.
- Emara, A. y El-Bahrawy, H. 2008. Green tea attenuates benzene-induced oxidative stress in pump workers. *Journal of Immunotoxicology*, 5(1): 69-80.
- Fernández, J. y Orono, A. 2001. Función hepática de trabajadores ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos mixtos en una industria petroquímica. *Investigación Clínica*, 42(2): 87-106.
- Ferreira, A. y Mastsubara, L. 2000. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defensa y estrés oxidativo. *Revista de Asociacion Medica Brasileira*, 43: 2-5.
- Fitzpatrick, A.; Jones, D. y Brown, L. 2012. Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal*, 17(2): 375-408.
- Forman, H.; Zhang, H. y Rinna, A. 2009. Glutathione: visión general de sus funciones de protección, medición y biosíntesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 1-12.
- Gérin, M.; Siemiatycki, J.; Désy, M. y Krewski, D. 1998. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene,

and styrene: results of a case-control study in Montreal *American Journal of Industrial Medicine*, 34: 144-156.

Gómez, A. 2012. Daño oxidativo del ADN de los glóbulos blancos, fragilidad de los glóbulos rojos y efecto antioxidante de la vitamina c y el zinc en individuos fumadores de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre.

Gresner, P.; Stepnik, M.; Król, M.; Swiercz, R.; Smok-Pieniazek, A.; Twardowska, E.; Gromadzińska, J. y Wasowicz, W. 2015. Dysregulation of markers of oxidative stress and DNA damage among nail technicians despite low exposure to volatile organic compounds. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 41: 579-593.

Gresner, P.; Świercz, R.; Beata, M.; Twardowska, E.; Gromadzińska, J. y Wasowicz, W. 2016. Does the Low-level occupational exposure to volatile organic compounds alter the seasonal variation of selected markers of oxidative stress? A case-control study in nail technicians. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 11: 1-11.

Grijota, F. 2015. Influencia del ejercicio físico en los niveles eritrocitarios de elementos minerales traza. Trabajo de Postgrado. Departamento de Fisiología. Universidad de Extremadura. España.

Haro-García, L.; Vélez-Zamora, N.; Aguilar-Madrid, G.; Guerrero-Rivera, S.; Sánchez-Escalante, V.; Muñoz, S.; Mezones-Holguín, E. y Juárez-Pérez, C. 2012. Alteraciones hematológicas en trabajadores expuestos ocupacionalmente a mezcla de benceno, tolueno y xileno (BTX), en una fábrica de pinturas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29: 181-187.

Hilal-Dandan, R. y Brunton, L. 2013. Metabolismo de fármacos. En: *Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica*. 2da edición. McGraw-Hill Medical. San Diego, California.

Hong, Y.; Shu, Y.; Chang, C y Hu, M. 2000. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese College students determined by various thiobarbituric acid test and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clinical Biochemistry*, 33(8): 619-625.

Ibrahim, K.; Saleh, Z.; Farrag, A. y Shaban, E. 2011. Protective effects of zinc and selenium against benzene toxicity in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 27(6): 537-545.

Insa, A. 2015. Análisis de polimorfismos en genes que codifican para enzimas que regulan el estrés oxidativo y su relación con la respuesta al tratamiento y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón. Tesis doctoral. Departamento de Medicina. Universidad de Valencia, España.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). 2017. Suministro de combustibles en gasolineras: exposición a gasolinas y gasóleos de automoción. <<http://stp.insht.es:86/stp/basequim/001-suministro-de-combustibles-en-gasolineras-exposici%C3%B3n-gasolinas-y-gas%C3%B3leos-de-automoci%C3%B3n>>. (17/07/2017).

Jaramillo, F. y Valdivia, A. 2016. *Fundamentos de estrés oxidativo celular*. Editorial Universidad Autónoma de Aguascaliente. México.

Korones, D. y Pearson, H. 1989. "Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis". *The Journal Pediatric*, 114(2): 264-266.

Lauwerys, R. 1994. *Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales*. Editorial Manson. España.

Lu, S. 2009. Regulación de la síntesis de glutatión. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 42-59.

Mahmood, N.; Alaamier, R.; Jaafar, T. y Zaki, Z. 2011. Total antioxidant status (TAO) & superoxide dismutase catalase enzymes in petrol station worker. *Iraqi Center for Cancer and Medical Genetic Research*, 5: 120-124.

Marlatt, M.; Lucassen, P.; Perry, G.; Smith, M. y Zhu, M. 2008. Alzheimer's disease: cerebrovascular dysfunction, oxidative stress, and advanced clinical therapies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 15: 199-210.

Martínez, G. 2014. Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST. Trabajo de Postgrado. Facultad de Química. Universidad Autónoma del Estado de México.

Martínez, M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*, 39(1): 5-18.

Martínez, M.; Cárabez, A.; Gallegos, M.; Pedraza, G.; Hernández, N. y Leo-Amador, G. 2010. Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *Journal of Applied Toxicology*, 30: 226-232.

Mayor, R. 2010. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes. *Journal of the Institute of Tropical Medicine*, 5: 1-3.

Moro, A.; Charão, M.; Brucker, N.; Durgante, J.; Baierle, M.; Bubols, G.; Goethel, G.; Fracasso, R.; Nascimento, S.; Bulcão, R.; Gauer, B.; Barth, A.; Bochi, G.; Moresco, R.; Gioda, A.; Salvador, M.; Farsky, S. y Garcia, S. 2013. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 754(1-2): 63-70.

Muller, S.; Riedel, H. y Wolfgang. St. 2007. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. *The American Society of Hematology. Blood*, 90(12): 4973-4978.

Muhammad, M.; Al-rahmman, S. y Mahmood, H. 2014. Effects of duration of exposure on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in liquefied propane gas workers+. "ResearchGate". <<https://www.researchgate.net/publication/257537048>> (28/03/2018).

Nagababu, E. y Rifkind, J. 2000. Structure basis of peroxide mediated changes in human hemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry*, 39: 12503-12511.

Newman, M. 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*. Fourth Edition. CPC Press. Florida, USA.

Odewabi, A.; Ogundahunsi, O. y Oyalowo, M. 2014. Effect of exposure to petroleum fumes on plasma antioxidant defense system in petrol attendants. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(2): 83-87.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85842/1/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1-spa.pdf?ua=1> (15/05/2017).

Ortiz, J. 2011. Daño oxidativo del ADN y efecto antioxidante de la vitamina c en glóbulos blancos de individuos expuestos a compuestos orgánicos volátiles en gasolineras de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Núcleo Sucre.

Ostrea, E.; Cepeda, E.; Fleury, E. y Balun, J. 2008. Membrana de la célula roja, peroxidación lipídica y hemólisis secundaria a la fototerapia. *Acta Pediátrica*, 74(3): 1651-2227.

- Owagboriaye, F.; Dedeke, G.; Aladesida, A.; Bamidele, J. y Olooto, W. 2016. Assessment of the effect of gasoline fume on stress hormones, antioxidant status and lipid peroxidation in albino rat. *Journal of King Saud University – Science*. <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.11.002>> (29/03/2018).
- Palma, M.; Briceño, L.; Idrovo, A. y Varona, M. 2015. Evaluación de la exposición a solventes orgánicos en pintores de carros de la ciudad de Bogotá. *Biomédica*, 35(Supl. 2): 66-76.
- Pérez, C.; Bosiab, J.; Cantore, M.; Chierad, A.; Cocozzella, D.; Adrovere, R.; Borzie, S. y Curciarello, J. 2006. Daño hepático en trabajadores expuestos a hidrocarburos. *Gastroenterología y Hepatología*, 29(6): 334-337.
- Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; De Tata, V. y Casini, A. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1499-1503.
- Prakash, M.; Shetty, S.; Tilak, P. y Anwar, N. 2009. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. *Current Science*, 8: 2-6.
- Quitamar, M. y Calderón, J. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28: 90-99.
- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2: 219-236.
- Ramírez, M. y Arizmendi, J. 2012. Importancia clínica del estrés oxidativo. *Current Science*, 57: 218-220.
- Rauchoca, H.; Vakurkova, M. y Koudelova, J. 2005. Developmental changes of erythrocyte catalase activity in rats exposed to acute hypoxia. *Revista Physiology*, 54: 527-532.
- Ríos, M. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*, 2: 1-12.
- Rosell, G.; Torrado, S. y Jiménez, N. 2011. Riesgos higiénicos de los trabajadores de estaciones de servicio. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Notas Técnicas de Prevención*, 775: 1-8.
- Santiago, C.; Bandrés, F. y Gómez-Gallego, F. 2002. Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo*, 11 (3): 130-140.

Santiago, F.; Lima, S.; Pinheiro, T.; Tavares-Silvestre, R.; Barros, O.; Medeiros, T.; Kosyakova, N.; Ornellas, M.; Liehr, T. y Alves, G. 2017. Benzene poisoning, clinical and blood abnormalities in two Brazilian female gas station attendants: two case reports. *BMC Research Notes*, 10(52): 1-5.

Schewedhelm, E.; Mossa, I.; Troost, R. y Boger, R. 2003. Pharmacokinetics clinical of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Current Science*, 45: 437-459.

Shih, H.; Yu, C.; Wu, M.; Liu, C.; Tsai, C.; Hung, D.; Wu, C. y Kuo, H. 2011. Subclinical abnormalities in workers with continuous low level toluene exposure. *Toxicology Ind Health*, 27: 691-699.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1980. *Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Editorial W. Freeman y Co. San Francisco.

Tejedor, C. 2010. Reacciones de conjugación. Cátedra Bioquímica Ambiental. Universidad de Alcalá. España. <http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/BA-RES-9.pdf> (29/03/2018).

Téllez, J.; Rodríguez, A. y Fajardo, A. 2006. Contaminación por monóxido de carbono: un problema de salud ambiental. *Revista de Salud Pública*, 8(1): 108-117.

Torres, Y. 2011. Estado oxidante-antioxidante en eritrocitos de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Trabajo Postgrado. Departamento de Bioquímica y Medicina Ambiental, Instituto Politécnico Nacional, México.

Towsend, D.; Tew, K. y Tapiero H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4): 145-155.

Ulusoy, G.; Adali, O.; Tumer, T.; Sahin, G.; Gozdasoglu, S. y Arinç, E. 2007. Significance of genetic polymorphisms at multiple loci of CYP2E1 in the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncology*, 72(1-2): 125-131.

Valko, M.; Jomova, K.; Rhodes, C.; Kuča, K. y Musílek, K. 2016. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, 90(1): 1-37.

Vibha, R. y Umesh, S. 2015. *Free radicals in human health and disease*. Editorial Springer. New Dheli, India.

Villegas, N. 2015. *Medicina del laboratorio. Revisión y actualización*. Editorial Amolca. Bogotá, Colombia.

Wasowicz, W.; Neve, J.; Peretz, A. y Néve, J. 1993. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clinic Chemical*, 39: 2522–2526.

Winterbourn, C. 1985. *Free radical production and oxidative reactions of haemoglobin*. *Environmental Health Perspective*, 64: 321-326.

Winston, G. y Di Giulio, R. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19: 137-161.

Xia, B.; Chen, K.; Lu, Y.; Huang, D.; Liu, J.; Liang, G.; Zhang, L.; Wang, F.; Su, C.; Zou, Y. y Yang, X. 2017. Aumento del estrés oxidativo y niveles plasmáticos de Hsp70 entre los asistentes de la estación de servicio de gasolina. *Toxicology and Industrial Health*, 33(2): 171-181.

Xiong, F.; Li Q.; Zhou, B.; Huang, J.; Liang, G.; Zhang, L.; Ma, S.; Qing, L.; Liang, L.; Su, J.; Peng, X.; Li, Q. y Zou, Y. 2016. Oxidative stress and genotoxicity of long-term occupational exposure to low levels of BTEX in gas station workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13: 1-9.

Zamora, D. 2007. Antioxidantes: nutrientes en la lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición Antioxidantes*, 34: 2-4.

ANEXO 1
Cuestionario

Muestra #: _____

Fecha: / /

2016

I.- Datos personales.

1. Nombre: _____

2.- Apellidos: _____

3.- Edad: _____

4.- Sexo: F: _____ M: _____

5.- Dirección de habitación: _____

6.- Ocupación actual: _____

7.- Lugar de trabajo: _____

8.- Horas diarias de trabajo: _____

II.- Cognoscitivos.

9.- ¿Cuánto tiempo tiene usted trabajando en la gasolinera?: _____

10.- ¿Trabajo usted en gasolinera cuando se distribuía gasolina con plomo?

~~Si:~~ ~~No:~~

En caso de ser afirmativo, ¿cuánto tiempo? _____

11.- ¿Es fumador

~~Si:~~ ~~No:~~

En caso de ser afirmativo, ¿Cuánto tiempo tiene fumando?: _____

¿Cuál es el promedio de cigarro fumados al día? _____

12.-¿Presenta alguna de estas enfermedades?

Hiperlipidemia: _____ Hipertensión: _____ Diabetes: _____

Otra:

Tiempo de duración con la enfermedad señalada: _____

Recibe tratamiento para la enfermedad señalada: Si: _____ No: _____

13.- ¿Consume algún fármaco o medicamento?: Si: _____ No: _____

En caso de ser afirmativo, especifique: _____

14.-¿Consume bebidas alcohólicas?: Si: _____ No: _____

Tipo de bebidas que consume: Vinos: _____ Ron: _____ Cerveza: _____

Whisky: _____

Frecuencia: Diaria: _____ Semanal: _____ Mensual: _____ Anual: _____

15.-¿Consume alguna de las siguientes sustancias?

Vit E: _____ Vit E+Selenio: _____ Vit C: _____ Vit A: _____ Otro: _____

Durante cuanto tiempo: _____

Por medio de la presente encuesta, hago constar que he dado mi consentimiento para que los datos aquí recopilados sean usados con fines de investigación

FIRMA DEL ENCUESTADO

ANEXO 2
Consentimiento valido

Bajo la coordinación de Dra. Sonia Nusetti se realizara el proyecto de investigación titulado: “DAÑO LIPOPEROXIDATIVO, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y FRAGILIDAD OSMÓTICA DE GLÓBULOS ROJOS EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE”

Yo: _____

CI: _____ Nacionalidad: _____ Estado civil: _____

Domiciliado en: _____

Siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin coacción, ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconveniente y riesgo relacionado con el estudio indicado, declaro mediante el presente:

1.- Haber sido informadas de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigadores de este Proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: “ DAÑO LIPOPEROXIDATIVO, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y FRAGILIDAD OSMÓTICA DE GLÓBULOS ROJOS EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE”.

2.- Tener conocimiento claro de que el objetivo del trabajo antes señalado es Evaluar el estrés oxidativo en glóbulos rojos de individuos trabajadores en dispensadores de combustibles.

3.- Conocer bien el Protocolo Experimental expuesto por el investigador, en el cual se establece que nuestra participación en este trabajo consiste en:

donar de manera voluntaria muestra de sangre, tomada por el investigador del proyecto.

4.- Que la muestra que aceptamos donar se utilizará única y exclusivamente para “DAÑO LIPOPEROXIDATIVO, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y FRAGILIDAD OSMÓTICA DE GLÓBULOS ROJOS EN TRABAJADORES DE

ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE”.

5.- La persona que realiza la investigación coordinada por la Dra. Sonia Nusetti, nos ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a nuestra identidad como a cualquier otra información relativa a nuestra persona a la que tenga acceso por concepto de nuestra participación en el proyecto antes mencionado.

6. Que bajo ningún concepto podríamos restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos para el presente estudio, que además podrá estar sujeto a publicaciones en revistas científicas.

7. Que nuestra participación en dicho estudio no implica riesgos e inconveniente alguno para mi salud.

8. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio nos será respondida oportunamente por parte del equipo de personas ant mencionadas.

DECLARACION DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas nuestras interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto a nuestra participación en este estudio es totalmente voluntaria, acuerdo:

1. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en la muestra de sangre venosa que aceptamos donar para fines indicados anteriormente.
2. Reservarnos el derecho de renovar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencias negativa para nuestra persona.

Firmas de los (as) voluntarios (as):

Nombre y apellidos: _____

C.I: _____

Lugar: _____

Fecha: _____

DECLARACION DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación de este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Nombre: _____

Lugar y Fecha: _____

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	DAÑO LIPOPEROXIDATIVO, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y FRAGILIDAD OSMÓTICA DE GLÓBULOS ROJOS EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Xiorimar Suniaga	CVLAC	17.779.761
	e-mail	sufixs@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biomarcadores
Glutation reducido
Glutation-S-transferasa
Catalasa
Combustible

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Bioanálisis	

Resumen (abstract):

Resumen

Los trabajadores encargados de dispensar combustibles en las estaciones de servicios se encuentran expuestos constantemente a compuestos orgánicos volátiles (COVs) provenientes de los combustibles. En este orden se procedió a evaluar el daño lipoperoxidativo, algunas defensas antioxidantes y la fragilidad osmótica en glóbulos rojos de individuos trabajadores en gasolineras en la ciudad de Cumaná (El Trebol, Nueva Toledo, Santa Rosa de Lima, San Luis, Venezuela y Virgen del Valle), estado Sucre. Se seleccionaron una suma de 30 trabajadores (aparentemente sanos) de estaciones de servicio (TES), con edades comprendidas entre 25 y 45 años, en comparación a un grupo considerado control (N=30). A cada uno de los individuos se les tomó muestras de sangre venosa, con la cual se determinó los parámetros hematológicos: hemoglobina (Hb), porcentaje de hematocrito (%Hto) y conteo de glóbulos rojos (GR); también se se cuantificó los niveles de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión reducido (GSH), proteínas totales, la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST). Adicionalmente se estimó la fragilidad osmótica de los GR. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las variables hematológicas, niveles de GSH, CAT, proteínas plasmáticas y fragilidad osmótica entre los dos grupos evaluados. Los TES presentaron los promedios más elevados de TBARS y GST en comparación al grupo control. Los resultados muestran señales de una condición de estrés oxidativo en eritrocitos de los TES, fundamentado en un incrementado daño oxidativo y actividad de GST. Tales hallazgos posiblemente sean consecuencia de la inhalación continua de COVs proveniente de su ámbito laboral. Los parámetros determinados pueden ser aplicados como índices de estrés y de exposición laboral a COVs.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Xiorimar Suniaga	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	17.779.761
	e-mail	sufixs@hotmail.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2018	07	27

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-Xiorimar.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: UNIVERSAL

Temporal: INTEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo:

Nivel Asociado con el Trabajo:

Área de Estudio:

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUAPEL
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.

Xiorimar Suniaga
AUTOR