



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

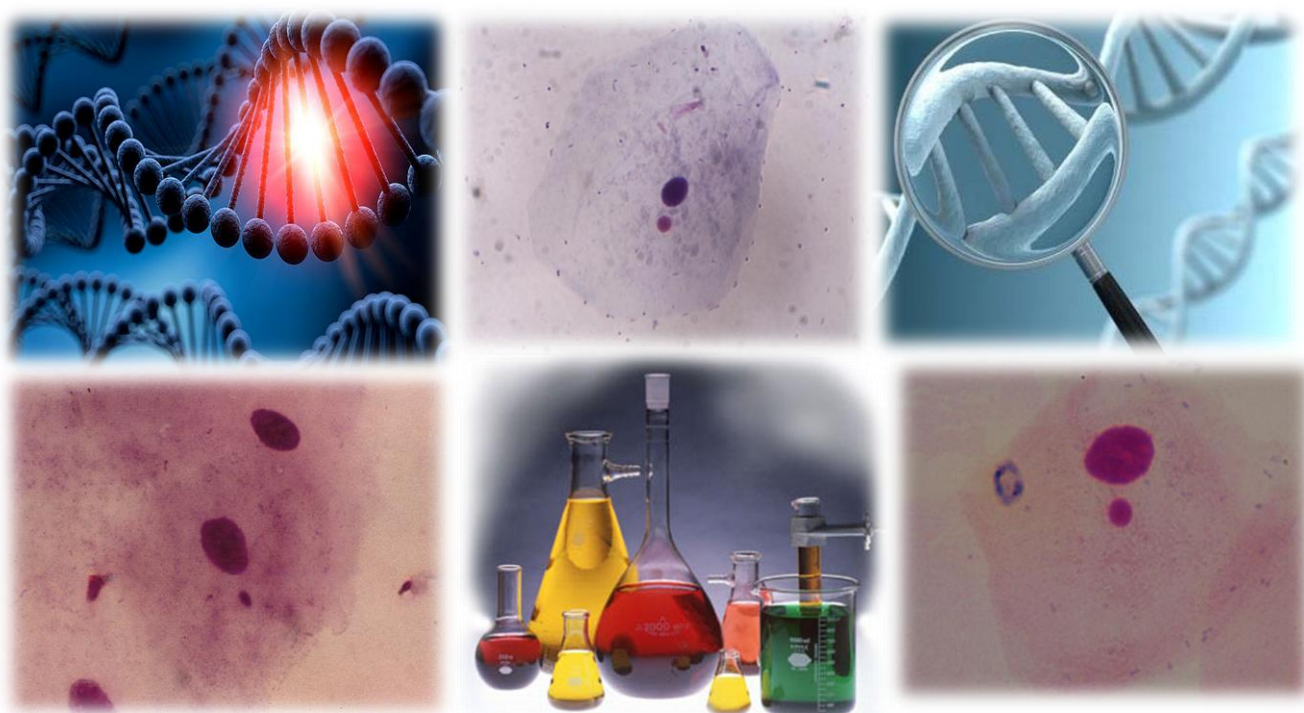
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Biomonitoreo citogenético de trabajadores del CBQ mediante el ensayo de micronúcleos

TESIS DE DIPLOMA

Autor: Jennifer Corchado Ramírez

Tutor: Dra. Gisselle Pérez Machado



Santa Clara

2015

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS**

TESIS DE DIPLOMA

**Biomonitoreo citogenético de trabajadores del CBQ mediante el ensayo
de micronúcleos**

Autora: Jennifer Corchado Ramírez

Tutora: Dra. Gisselle Pérez Machado

Centro de Bioactivos Químicos Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Dirección Postal. Nazareno 51 esquina Colón. Santa Clara, Villa Clara,

gissellep@uclv.edu.cu

Santa Clara

2015

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento”.

Louis Pasteur

A mi familia, por apoyarme tanto y especialmente a mi madre, por guiarme y caminar a mi lado en aquellos momentos en los que pensé volver atrás por haberme perdido en el camino.

Agradecimientos

A todos los trabajadores del CBQ por su participación voluntaria en este estudio, principalmente a aquellos del área biológica, a Osmani y Edisleidis por ayudarme siempre, a Aliuska por su paciencia, y sobre todo a mi Tutora: Gisselle Pérez Machado, por enseñarme tanto, por estar dispuesta a ayudarme aún cuando ya no quedaba tiempo, por su esfuerzo y dedicación para conmigo y este trabajo, puesto que sin ella, esta tesis no hubiera estado lista para la fecha prevista, y a Daymí por no dejarme desamparada.

A todos los profesores del departamento de biología por sus exigencias y por todos los conocimientos que me brindaron, así como aquellos que no pertenecen al departamento, pero que de una forma u otra contribuyeron en mi formación profesional.

A mi familia, pero sobre todo mis abuelos, por sus mimos, dándome sin censura, a mi hermana por ser mi amiga y confidente, y a mi madre por sus inagotables consejos, sus sacrificios, su paciencia para conmigo, su cariño y ternura, gracias por ser mi guía, mi guardián, mi inspiración. Gracias a todos por apoyarme, por aguantar mis cambios de humor, y mi inestabilidad, gracias por ser la mejor familia del mundo. A Sulén, por brindarme la más antigua e incondicional amistad.

A mis compañeros y amigos de aula, por ayudarme siempre que lo necesitaba y por todos esos momentos felices que pasamos juntos. A Lisadis, Sahily y Mayara por aguantarme estos cinco años en la difícil tarea que es la convivencia, a mis pichones del C4, José Rey y Henry, por hacerme siempre sonreír y especialmente a Randel, por depositar tanta confianza en mí, a Manuel por trazarse como meta levantarme el ánimo en momentos de tristeza sin importar la causa que me acongojaba, y a Daniel por escucharme, por ser mi compañero, mi camarada, mi hermano y a veces hasta mi padre, por estar siempre ahí para mí. Gracias a ustedes por ser mis confidentes y más fieles amigos, por las locuras que pasamos juntos, los buenos y los malos momentos, por tantas experiencias adquiridas. Gracias a todos, ustedes han sido mi mejor escuela. Por último, pero no menos importante agradecer a Mollineda, por apoyarme y brindarme siempre, todo aquello que necesité.

Resumen

Las sustancias químicas se usan ampliamente en el mundo moderno para múltiples fines, sin embargo su exposición representa un potencial riesgo para la salud humana. Los estudios de biomonitorio humano son una valiosa herramienta para estimar el riesgo genético de la exposición a mezclas complejas de químicos en condiciones rutinarias de trabajo. Se realizó un estudio citogenético para estimar los posibles daños genéticos en 39 trabajadores del CBQ, 14 expuestos y 25 controles, usando el ensayo de micronúcleos (MN) en células epiteliales bucales. Los grupos fueron homogéneos en relación a edad, sexo, hábito de fumar, consumo de alcohol, antecedentes familiares de cáncer, estilos de vida y otros. La media de células con MN en el grupo expuesto fue significativamente mayor (10.79 ± 2.65) que en los controles (5.96 ± 2.47). Se observaron otras anomalías nucleares en las células bucales (células con gemación, células cariorréticas, picnóticas, cariolíticas, binucleadas y con cromatina condensada). La frecuencia de MN se asoció significativamente con las variables: exposición, nivel y tipo de riesgo, exposición a sustancias pulverizadas y a derivados del carbono. Se encontraron otras asociaciones con el consumo de pescado, carne roja y frutas. En resumen nuestros hallazgos sugieren que la exposición ocupacional junto a otros factores asociados a estilos de vida podría estar relacionada con una mayor incidencia de micronúcleos en trabajadores del CBQ.

Palabras Clave: Exposición ocupacional, ensayo de micronúcleos, células epiteliales bucales

Abstract

Chemicals are world-widely used to many purposes; nevertheless, their exposure represents a potential risk to human health. Human biomonitoring provides a useful tool to estimate the genetic risk from exposure to a complex mixture of chemicals under routine working conditions. In order to assess possible genetic damage on CBQ workers, 14 exposed workers and 25 non-exposed individuals, a cytogenetic study was carried out by applying the micronucleus (MN) assay on the buccal epithelial cells. The groups were homogeneous regarding age, sex, smoking habit, alcohol consumption, family history of cancer, life style, and others variables. The mean number of micronucleated cells in the exposed group (10.79 ± 2.65) was significantly higher than in controls (5.96 ± 2.47). Other nuclear anomalies in buccal cells (cells with nuclear buds, karyorrhectic, pyknotic, karyolytic, binucleated and condensed cells) were also observed. The MN frequency was associated with variables like: exposure, degree and nature of risk, exposure to powdery substances and carbon derivatives. In addition, we found others association with the consumption of fish, red meat and fruit. In summary, our findings suggested that occupational exposure together with other factors associated with lifestyle might be linked to an increased incidence of micronuclei in CBQ workers.

Keywords: Occupational Exposure, micronucleus tests, buccal epithelial cells

ÍNDICE	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	2
1.2. Objetivos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Riesgo biológico	4
2.1.1. Antecedentes	4
2.1.2. Evaluación del riesgo	5
2.1.3. Riesgo genético	5
2.2. Biomonitorización	6
2.2.1. Valoración de la exposición	7
2.2.2. Medidas de dosis-respuesta	7
2.2.3. Exposición laboral y riesgo genético	7
2.3. Biomarcadores	8
2.3.1. Biomarcadores citogenéticos	9
2.3.2. Micronúcleos: ventajas e inconvenientes del ensayo	10
2.4. Exposición ocupacional en el Centro de Bioactivos Químicos	16
2.4.1. Características particulares de la exposición	17
2.4.2. Efectos sobre la salud	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Población estudiada	23
3.2. Cuestionarios	23
3.3. Ensayo de MN en mucosa bucal	24
3.3.1. Obtención y preparación de las muestras	24
3.3.2. Protocolo	24
3.3.3. Análisis estadístico	25
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	44
7. RECOMENDACIONES	45
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS	47

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente es difícil concebir alguna actividad en la sociedad moderna en la cual no intervenga o haya intervenido una gran variedad de productos químicos. De ahí que el aprovechamiento de numerosas sustancias se identifique como indicador de desarrollo, sin embargo, este proceso también trae aparejado importantes problemas ambientales que afectan a la humanidad y los ecosistemas (Kirsch-Volders *et al.*, 2014).

Existe unanimidad entre la comunidad científica respecto a la necesidad de caracterizar el peligro que representa para la perennidad de los ecosistemas y la salud del hombre la presencia incrementada de agentes xenobióticos.

El interés primigenio por los efectos tóxicos de las sustancias químicas se centraba en aquellas sustancias que actuaban rápidamente afectando la vida o la salud, sin embargo hoy se ha ido incrementado la atención sobre compuestos que causan efectos adversos detectables solo después de largos períodos de exposición. En este grupo se incluyen los que actúan directa o indirectamente sobre el ADN conocidos como compuestos genotóxicos. Estos agentes pueden modificar la estructura del ADN en células somáticas y germinales, tanto a nivel génico, como cromosómico (Arellano *et al.*, 2013), siendo ese potencial genotóxico un factor de riesgo primario para efectos tales como carcinogénesis y teratogénesis (Ascarrunz *et al.*, 2005).

La genética toxicológica surge como disciplina que asume el reto de evaluar la genotoxicidad y riesgo carcinogénico de agentes químicos, físicos o biológicos (Arencibia *et al.*, 2003). Se complementa con la genética, la toxicología, la ecotoxicología, y otras disciplinas en el esfuerzo por caracterizar y prever los riesgos probables de los xenobióticos sobre la salud humana y los ecosistemas. Para ello se valen del monitoreo ambiental y el monitoreo biológico. Mientras el monitoreo ambiental establece las formas mediante las cuales se liberan los compuestos y determina cuál es su destino en ambiente, el biológico evalúa los efectos adversos sobre individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas expuestos (Larrea, 2007).

Significativa atención se le ha prestado al monitoreo biológico basado en marcadores de exposición y de respuesta. Las aberraciones cromosómicas (AC) se han usado como signo de advertencia temprana para el desarrollo de cáncer (Ascarrunz *et al.*, 2005), y por ende como biomarcador citogenético para establecer correlaciones entre factores de riesgo y la mayor incidencia de enfermedades genéticas o cáncer.

Las técnicas citogenéticas más utilizadas para detectar cambios cromosómicos estructurales y numéricos, y evaluar el riesgo genético de determinadas poblaciones expuestas a mutágenos, son las de análisis de AC y de micronúcleos (MN) (Ascarrunz *et al.*, 2005).

Los estudios clásicos se basan en la detección de las alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica, pero cada vez se impone más la búsqueda de tejidos que supongan menos invasividad, con lo cual las células exfoliativas de tejidos epiteliales se han adoptado como un material biológico sensible y de fácil manejo. Particularmente el ensayo de micronúcleos (MN) en epitelios de descamación ha demostrado ser una técnica sensible, sencilla, no invasiva, ideal para monitorear la exposición a carcinógenos (Nersesyan y Ilin, 2007, Bolognesi *et al.*, 2013).

En el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de las Villas, se han sintetizado una serie de compuestos bioactivos de la familia de los furiletilenos, siendo la síntesis y algunas acciones biológicas objetos de invención con patentes concedidas en 18 territorios que incluyen Cuba (Cuba No. 22 446; 1994; No 22677, 2000; No. 22932, 2003) y varios países de Europa (España No. 1249449, 2002; España, Francia, Italia, No 06791280, 2009), Latinoamérica (México No. 225947, 2004; Brasil PI0107723-6, 2011), Asia (China No. ZL 01803842.5, 2004) y EUA (USA No. US 6,624, 316 B2, 2003).

Este quehacer ha conllevado la caracterización toxicológica de los ingredientes activos y su desarrollo a ciclo completo en CBQ, sin embargo los trabajadores que por más de 20 años han estado implicados en la síntesis, caracterización, análisis y evaluación de estos compuestos no han sido estudiados en relación al riesgo genético que implica su exposición ocupacional, por lo que se hace necesario utilizar un biomarcador citogenético que permita biomonitorear este grupo laboral.

Problema científico

El riesgo genético que supone la exposición ocupacional de los trabajadores del CBQ a varias sustancias químicas en los procesos de síntesis, análisis o manipulación no han sido estudiados.

1.1. Hipótesis

El posible riesgo genético que implica la exposición ocupacional para los trabajadores del CBQ podrá ser caracterizado por medio del ensayo de Micronúcleo en mucosa bucal, como biomarcador citogenético

1.2. Objetivos

General

Evaluar el posible daño genotóxico derivado de la manufactura y manejo del principio activo G-1 y el producto Vitrofuroral a través del biomarcador micronúcleos en células epiteliales.

Específicos

1. Describir las características demográficas y sanitarias del grupo poblacional descrito.
2. Determinar la relación entre la exposición y la inducción de alteración genética (clastogenicidad, y aneugenicidad) mediante el ensayo de micronúcleos.
3. Buscar la posible asociación de varios factores ambientales (género, hábitos, alcohol, y tabaco, etc.) sobre el riesgo genético en la población de estudio.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Riesgo biológico

2.1.1. Antecedentes

Las sustancias químicas están en la mayoría de los productos que utilizamos y consumimos. Su ciclo de vida se inicia con la extracción en la naturaleza o su síntesis química, continúa con su formulación para uso y termina con su eliminación al finalizar su periodo útil. En cada una de las fases los trabajadores están expuestos a sus efectos, en muchos casos letales, como ilustración, la utilización del amianto, del benceno, de plaguicidas como el DDT, o metales pesados, como el mercurio, entre otros (Canales-Aguirre *et al.*, 2011, Cassiani, 2011, Moran-Martinez *et al.*, 2013).

La historia nos ha demostrado que aprendemos tarde, cuando los daños son demasiado importantes para la salud de los trabajadores, y con frecuencia para la sociedad civil y para el medio ambiente. Los efectos se manifiestan, en muchos casos, cuando ya no hay solución; por lo que las respuestas suelen llegar a destiempo, quedándonos en estos casos la presión y la denuncia para la eliminación del producto tóxico, cuando lo lógico sería utilizar sustancias que no entrañen peligro conocido para los trabajadores. Las políticas de las empresas productoras de sustancias químicas y las empresas que las utilizan en sus procesos productivos suelen no considerar si los mismos son inocuos o no; simplemente si son útiles para lograr el fin perseguido.

En los albores de las civilizaciones humanas la exposición a xenobióticos no era significativa en términos de magnitud y diversidad por lo que la preocupación pública al respecto era pequeña, centrándose el interés en aquellos agentes que actúan rápidamente produciendo la muerte (Borgert *et al.*, 2015).

Sin embargo, sea de forma inadvertida, accidental e incluso inevitable todos los organismos están expuestos a elementos que por sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas, son capaces de provocar reacciones biológicas de carácter tóxico que resultan no solo en la muerte sino en alteraciones morfológicas, funcionales, y/o bioquímicas, presentadas como fenómenos de mutagenicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad, o enfermedades de diversas índole (Cima, 2011, Calabrese *et al.*, 2015).

En la actualidad se ha incrementado el uso, tanto en cantidad como en variedad de sustancias que interacciona con elementos bióticos del ecosistema, y con ello la atención sobre los efectos adversos mediatos y los que se producen después de largos periodos de exposición. Hay dos razones principales para este cambio; una es que el promedio de vida del hombre se ha incrementado

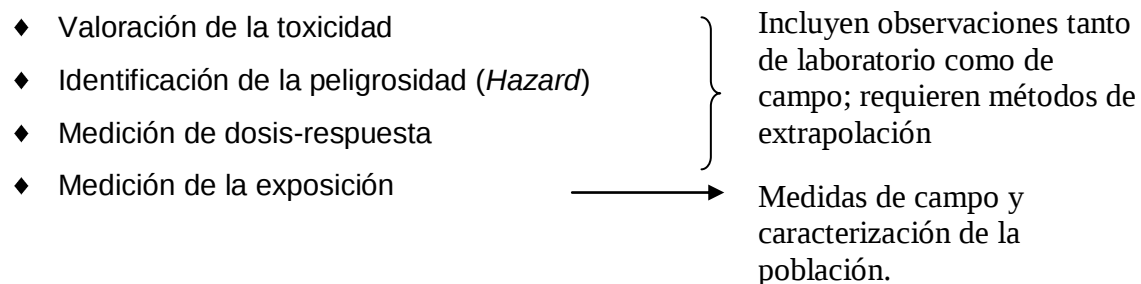
enormemente debido a los cuidados y tratamientos de enfermedades infecciosas; tomando las enfermedades no infecciosas de naturaleza crónica una mayor relevancia. La segunda razón es el incremento en la presencia de sustancias químicas en la vida diaria. Hoy día la problemática de la contaminación se considera como una de las consecuencias inevitables del progreso tecnológico (Feretti *et al.*, 2014).

2.1.2. Evaluación del riesgo

La toma de conciencia sobre este riesgo potencial originó el problema de cómo evaluar la severidad de la amenaza que cada tóxico tendría bajo determinadas condiciones de uso. Esta acción se conoce como evaluación del riesgo (*Risk Assessment*) y se basa en la medición de la capacidad de inducir daño que una determinada sustancia posee, es decir su toxicidad, y en la evaluación de las consecuencias de la potencial exposición de los humanos bajo situaciones particulares, como por ejemplo en el ambiente laboral (Pastor, 2002).

El concepto de evaluación del riesgo no era una novedad en los años 70, ya que tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica la valoración de los posibles efectos tóxicos de los diferentes productos utilizados se estaba llevando a cabo desde comienzo de siglo, aunque a baja escala. No obstante en los años 70 los procedimientos de análisis de riesgo para todos los compuestos químicos fueron reevaluados, mejorados y, lo que es más importante, validados. Así mismo, se desarrollaron nuevas técnicas estandarizadas para una evaluación más consciente, ajustadas a las pautas del método científico (Brusick, 1987, Gentile, 1988).

La NCEA, *National Center for Environmental Assessment*, de EEUU, define la valoración del riesgo como un proceso que incluye varias etapas (Albertini, 2001b):



2.1.3. Riesgo genético

En un comienzo, la definición del término de riesgo genético se refería “al desarrollo de estimas cuantitativas de inducción de mutaciones transmisibles como consecuencia de una exposición determinada” (Gentile, 1988, Brusick, 1994). Así, las pruebas que cumplían estas condiciones eran

aquellas capaces de medir daño en las células germinales, o efectos heredables en las sucesivas generaciones de los individuos expuestos. Actualmente, el concepto de riesgo genético es más amplio, requiriéndose la extrapolación en la interpretación de las pruebas utilizadas, ya no exclusivamente para la línea germinal, sino en diferentes células somáticas, para su aplicación en las investigaciones de cáncer y sus posibles causas (Lewtas, 2007).

La exposición a agentes ambientales puede originar una amplia variedad de efectos que pueden manifestarse inmediata o tardíamente y que puede ser monitoreada.

Cuando el interés consiste en determinar la naturaleza y proporción del agente potencialmente genotóxico, se siguen dos diseños de investigación:

- Estudios de poblaciones humanas
- Experimentos con animales de laboratorio

El análisis del riesgo es un proceso complejo que depende de la calidad de la información científica de la que se dispone. La incertidumbre aumenta cuanto mayor es el período de tiempo transcurrido entre el momento de la exposición y la aparición de síntomas, ya que son muchos los factores que intervendrán en el efecto final a determinar. En no pocas situaciones, estas incertidumbres hacen prácticamente imposible hallar conclusiones definitivas respecto al riesgo (Wultsch *et al.*, 2014).

2.2. Biomonitorización

Los estudios de biomonitorización intentan establecer la relación entre los factores ambientales y la salud. La fortaleza de un estudio de este tipo dependerá del número de casos y controles incluidos en el estudio: cuantos más casos individuales se incluyan mayor será la probabilidad de que se encuentre una asociación significativa, ya sea positiva o negativa. Los estudios de biomonitoreo pueden basarse en el análisis de los compuestos químicos o sus metabolitos, en muestra de sangre, orina, pelo, etc., o también pueden evaluar el riesgo de exposición mediante la determinación de las posibles alteraciones, tanto físicas como bioquímicas (Larrea, 2007).

De igual manera, importará el tipo de parámetro elegido para la valoración, su correcta interpretación y diferenciación de los factores de confusión, entendiendo como tales al resto de características de la población, a nivel general e individual, que constituirán las variables a considerar en el posterior análisis.

En última instancia, los estudios de biomonitorización están destinados a completar estudios epidemiológicos, es decir análisis de correlación entre el factor de riesgo analizado y una mayor

incidencia de cáncer o enfermedades genéticas en la población expuesta, (Peralta *et al.*, 2011) ello implica que proporcionarán una estima de asociación pero no de causalidad.

2.2.1. Valoración de la exposición

En el sentido más estricto, ésta se refiere al examen directo de la población, es decir la medición directa de la/s sustancia/s de interés, o sus metabolitos, en los fluidos orgánicos; sin embargo su utilidad se limita a situaciones concretas (Pastor, 2002):

- la sustancia, o sus metabolitos, son conocidas;
- no se presenta como muestra compleja;
- es especialmente aplicable en situaciones de exposición reciente, ya que los cambios producidos en el organismo tienden al equilibrio a medida que pasa el tiempo, esto impide el conocimiento de duración y magnitud de la exposición.

En general, las valoraciones directas resultan fiables cuando se trata de eventos recientes.

La evaluación de la exposición debería estar basada sobre cuestionarios y marcadores caracterizando exposición interna y externa (Bonassi *et al.*, 2009).

2.2.2. Medidas de dosis-respuesta

Se debe hacer la distinción entre dos situaciones o tipos de exposiciones:

AGUDA: es en principio la más fácil de valorar. En el caso concreto de poblaciones humanas, se utilizan como referencia los valores obtenidos en accidentes medio ambientales, que son buenos indicadores de los niveles en los que un agente o sustancia producirá efectos adversos en el ser humano

CRÓNICA: es la situación más frecuente y también la más difícil de evaluar, y en este caso son de particular relevancia los estudios epidemiológicos. En los mismos, determinadas poblaciones humanas son detalladamente observadas en base a ensayos que permitan establecer correlaciones entre exposiciones específicas y el efecto particular que se estudia. De especial interés y aplicación en estos estudios es la investigación en ambientes laborales, donde la exposición es prolongada y a dosis relativamente altas de mezclas de sustancias potencialmente genotóxicas (Burkart y Jung, 1998, Seffrin *et al.*, 2009).

2.2.3. Exposición laboral y riesgo genético

Idealmente, la monitorización de los posibles efectos genotóxicos de mutágenos ambientales puede utilizarse para las estimas de riesgo. Sin embargo, si el daño genético es reparado, poca o ninguna

evidencia existirá para que pueda relacionarse con mutaciones heredables o tumores. Además, las exposiciones crónicas se ven limitadas en su análisis ya que los efectos genotóxicos expresados como incrementos en las frecuencias de aparición de enfermedades genéticas y procesos malignos, no se producen sino después de un determinado período de tiempo. Es a partir de estas limitaciones que los esfuerzos en investigación se destinaron, en primera instancia, a la aplicación de los test de mutagenicidad a corto plazo (*Short Term Test*) para mezclas complejas, con el fin de evaluar la exposición humana a agentes mutagénicos/carcinogénicos, y proporcionar medidas de *screening* de las fases tempranas de la alteración de la salud. Los resultados de tales ensayos de mutagenicidad han resultado de gran valor en la predicción de la carcinogénesis (Brusick, 1994, Manno *et al.*, 2014, Groh *et al.*, 2015).

A través de los estudios epidemiológicos llevados a cabo en poblaciones de trabajadores industriales fue posible demostrar varias correlaciones de gran interés: que el amianto está fuertemente ligado al cáncer de pulmón, el cloruro de vinilo a una forma particular de cáncer hepático y el benceno a la leucemia (Surralles *et al.*, 1997, Celik *et al.*, 2003, Radziszewska *et al.*, 2015). También hay varias referencias acerca de la asociación entre la incidencia de cáncer y la exposición a plaguicidas en los agricultores (Bortoli *et al.*, 2009, Benedetti *et al.*, 2013, Krishnatreya *et al.*, 2015, Salerno *et al.*, 2015, Welton *et al.*, 2015).

2.3. Biomarcadores

Los estudios epidemiológicos pueden biomonitorizar el riesgo a través de biomarcadores.

El término biomarcador hace referencia a cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental, ya sea químico, físico, o biológico (Pastor, 2002). También han sido definidos como una alteración en los componentes celulares, bioquímicos, procesos, estructura o funciones, que nos permiten definir el tipo de daño que sobre la salud está acaeciendo, y que son medibles en una muestra o sistema biológico (Bonassi *et al.*, 2009).

Según Albertini y colaboradores, los biomarcadores se pueden dividir en tres grupos: biomarcadores de exposición, de efecto y de sensibilidad (Albertini, 2001a, b, 2004).

Los biomarcadores de exposición indican que el agente ha entrado en el organismo, proporcionando información cuantitativa sobre la exposición y el ingreso de sustancias tóxicas en el organismo. Se basan en estimas y mediciones de dosimetría interna, o sea de la valoración de la concentración de los xenobióticos y/o sus metabolitos en los medios biológicos. Los biomarcadores de exposición detectan también la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinógenos o sus metabolitos en diversos tejidos o secreciones corporales.

Los biomarcadores de efecto reflejan la interacción del químico con los receptores biológicos. Estas alteraciones pueden anteceder al daño estructural, y su detección permitir la identificación precoz de exposiciones excesivas o peligrosas ya sean lesiones que indican estados avanzados del proceso de daño. Estos últimos llegan a ser cambios permanentes en la célula, órgano u organismo producidos por exposiciones pasadas, lo que los hace útiles para el estudio de daño acumulativo. Si nos restringimos al caso de compuestos químicos potencialmente genotóxicos, los biomarcadores de efecto serán aquellos parámetros que permiten identificar cambios que afectan la integridad de material genético, a nivel cromosómico o genómico.

Los biomarcadores de sensibilidad por su parte se utilizan para identificar aquellos individuos dentro de una población que, por sus características genéticas, son más susceptibles a los daños causados por diversos agentes ambientales

La identificación de todos estos biomarcadores de genotoxicidad es muy útil ya que puede definir un estado de prepatogénesis, de vital importancia para la prevención de la enfermedad, que es el objetivo final de la biomonitorización (Pastor, 2002).

2.3.1. Biomarcadores citogenéticos

Si se quiere detectar un daño cromosómico, los biomarcadores de efecto que se pueden utilizar incluyen las aberraciones cromosómicas (AC), los micronúcleos (MN), y cambios más sutiles como los intercambios de cromátidas hermanas (SCE) y, si se quiere detectar un daño génico, se pueden analizar las mutaciones puntuales. Los primeros son conocidos como biomarcadores citogenéticos y revelan lesiones que incluyen roturas cromatídicas o cromosómicas, reordenamientos y mala segregación cromosómica. Los métodos más extensamente empleados para determinar tales efectos, se han realizado clásicamente en linfocitos de sangre periférica (Yildirim *et al.*, 2006, Fenech *et al.*, 2011) y en células epiteliales (Fan *et al.*, 2006, Haveric *et al.*, 2010) (Tabla I).

Tabla I. Comparación cualitativa de los diferentes parámetros citogenéticos

Parámetro	Efecto detectado	Células	Sensibilidad	Especificidad	Recuento
AC estructural	mutación oncogenicidad letalidad	linfocitos médula ósea esperma	elevada	agentes clastógenos	especializado tedioso

AC numérica	mutación oncogenicidad letalidad	linfocitos médula ósea esperma	media	agentes que alteran las proteínas	menos especializado y menos tedioso
SCE	?	linfocitos médula ósea	muy elevada	amplio rango	no especializado menos tedioso
MN	mutación oncogenicidad	linfocitos mucosa bucal médula ósea esperma	media	agente clastógeno alteración de proteínas	no especializado menos tedioso

La elección de un determinado parámetro citogenético depende de varios factores (Nefic y Handzic, 2013):

- a-** la relevancia de la detección directa del daño genético, o un marcador que lo refleje;
- b-** la disponibilidad de células para llevarlos a cabo;
- c-** la sensibilidad de la prueba para la detección de bajos niveles de exposición;
- d-** la capacidad de detectar efectos residuales de exposiciones antiguas;
- e-** la especificidad con respecto al mutágeno a detectar;
- f-** la exactitud y facilidad en el recuento.

Cualquier parámetro elegido significará, inevitablemente, una situación de compromiso entre estos diferentes factores (Albertini, 2001b).

Así, las radiaciones ionizantes inducen daño de tipo cromosómico en G-0 y G-1; cromosómico y cromatídico en S, y de tipo cromatídico en G₂. En tanto con los mutágenos químicos, las aberraciones producidas son básicamente del tipo cromatídico: las lesiones inducidas han de pasar por la fase de síntesis para que se manifiesten como aberraciones. Estos agentes, también denominados *S-dependientes*, son inductores eficientes de SCE.

2.3.2. Micronúcleos: ventajas e inconvenientes del ensayo

Los MN, son pequeños núcleos con membrana definida que presentan una apariencia morfológica redonda o almendrada, similar a la del núcleo principal de la célula, con un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras; son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly. Se tratan de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros resultantes de acciones

clastogénicas (roturas cromosómicas) o aneugénicas (venenos del huso), respectivamente. Estos fragmentos o cromosomas carecen del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático y se retrasan durante la división celular quedando excluidos del núcleo principal de la célula interfásica. De modo que si el compuesto estudiado es un clastógeno, se formarán micronúcleos pequeños, pero si es un aneuploidógeno, lo que observaremos será la formación de micronúcleos grandes (González y Gómez-Meda, 2006).

Por otro lado, esta técnica revela los efectos citotóxicos (apoptosis y necrosis) de células previamente expuestas a sustancias químicas, físicas y de origen biológicos (Holland *et al.*, 2008, Hintzsche y Stopper, 2010). La Figura 1 muestra esquemáticamente el origen citogenético de los MN.

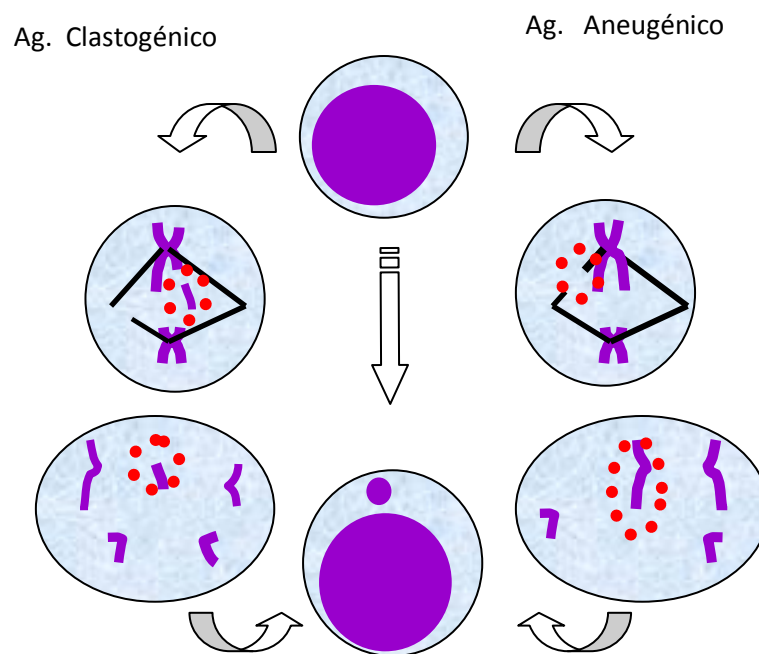


Figura 1. Origen citogenético de los MN

Este origen citogenético confiere dos implicaciones importantes a los MN (Cassiani, 2011):

- Se requiere una división celular (que las células sean mitóticamente activas) para que los MN se expresen en la población celular.
- Para que se generen es necesario una acción clastogénica (rotura cromosómica) o aneugénica (daño en el sistema de microtúbulos, en la región centromérica o en las proteínas del cinetocoro) (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

El hecho de que se puedan identificar los efectos producidos por agentes clastogénicos y aneugénicos permite al ensayo detectar diferentes tipos de lesiones (Migliore L *et al.*, 1996, Pastor, 2002, Basu *et al.*, 2004, Bonassi *et al.*, 2009):

- Roturas de doble cadena de ADN
- Roturas de cadena simple de ADN, mal reparadas o sin reparar. La mayoría de MN derivan de la mala reparación de diferentes lesiones, por lo que el ensayo de MN también se podría utilizar para evaluar la eficacia de la reparación.
- Alteraciones de las proteínas implicadas en la segregación cromosómica.
- Diferentes aberraciones cromosómicas, que pueden dar lugar a MN.
- Apoptosis, mediante la frecuencia de núcleos condensados.

Los MN tienen un doble significado biológico; los originados por agentes clastogénicos tendrán igual efecto que el producido por las aberraciones cromosómicas, dado que a nivel celular son equivalentes las lesiones. Así, en función de la cantidad de ADN y de la región involucrada en la rotura serán más o menos graves las consecuencias, pudiendo incluso provocar la muerte celular. Dicha muerte ha sido asociada a procesos de envejecimiento, alteraciones vasculares, e inducción de carcinogénesis (Torres-Bugarin *et al.*, 2014).

Por su parte, los MN producidos por aneugénesis tienen variadas y graves consecuencias sobre la salud humana, las aneuploidías somáticas o germinales se correlacionan con desórdenes genéticos diversos, abortos espontáneos, retraso mental y carcinogénesis (Torres-Bugarin *et al.*, 2014).

El ensayo para detectar los MN fue descrito por W. Schmid en 1975, quien originalmente la propuso para practicarse en medula ósea de ratón. Para su desarrollo es indispensable utilizar un tejido en constante división, por lo que la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos de diferentes especies: eritrocitos policromáticos de médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina y vejiga, entre otros (Fig. 2) (Schmid, 1975, González y Gómez-Meda, 2006).

Desde su desarrollo, el ensayo ha sido utilizado no con poca frecuencia en estudios de vigilancia de exposición laboral a bajas dosis de sustancias potencialmente mutagénicas/carcinogénicas, destacando su utilidad como biomarcador temprano en el análisis de riesgo de cáncer y otras patologías (Suhas *et al.*, 2004, Furness *et al.*, 2010, Nersesyan y Chobanyan, 2010). Según el resultado de una encuesta realizada en varios laboratorios europeos (Bonassi *et al.*, 2011, Fenech *et*

al., 2011, Kirsch-Volders *et al.*, 2014) se pueden puntualizar las siguientes ventajas y desventajas del ensayo:

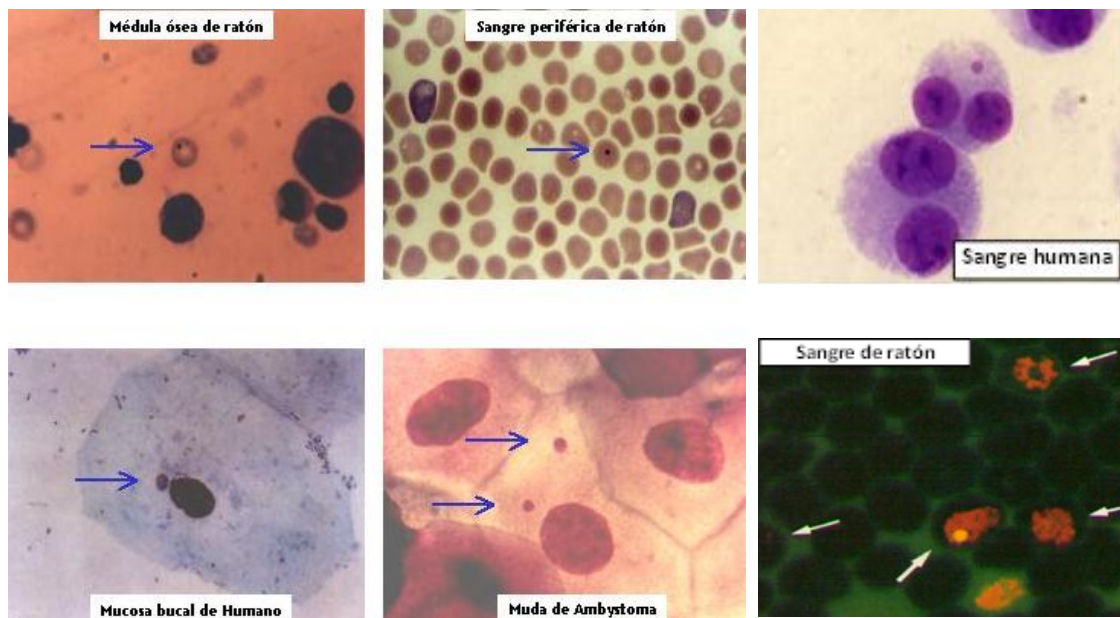


Figura 2. Microfotografías de células MN en diferentes tejidos y especies. Fotos propias y cortesía de Dra. Gisselle Pérez Machado

VENTAJAS

- 👍 La principal: la rapidez y simplicidad de la técnica.
- 👍 Permite la detección de agentes clastogénicos y aneugénicos.
- 👍 No requiere personal especializado para su recuento.
- 👍 Permite el recuento de un número elevado de células, haciéndolo especialmente aplicable para ensayos de monitorización de rápida determinación en salud laboral, y brindándole por el mismo motivo mayor poder estadístico.
- 👍 Los portaobjetos tratados con la tinción de color clásica (Giemsa) pueden reevaluarse mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, FISH.
- 👍 Los MN inducidos *in vivo* persisten en el tiempo y pueden detectarse *in vitro*.
- 👍 La frecuencia basal es baja.
- 👍 Los estudios *in vitro* no requieren gran cantidad del producto a evaluar.

INCONVENIENTES

- ☞ Incapacidad para determinar el tipo de aberración cromosómica.
- ☞ Alta variabilidad interindividual e interlaboratorios en las frecuencias de MN.
- ☞ Está considerablemente influenciado por variables experimentales y biológicas, lo que hace aún más importante el control de calidad del ensayo y un protocolo estandarizado (Castro *et al.*, 2004)
- ☞ No es un parámetro adecuado para la determinación de exposiciones pasadas, ya que tienen su origen en las aberraciones inestables.

Más allá de las controversias planteadas, no cabe duda que puede resultar una buena y eficaz alternativa al ensayo de AC, principalmente en situaciones donde se requiere una evaluación rápida de un colectivo relativamente numeroso.

La alta confiabilidad y el bajo costo de la técnica del MN, ha contribuido al éxito y a la adopción de este biomarcador para estudios, *in vitro* e *in vivo*. El amplio uso del ensayo de MN es una oportunidad para aplicarlo en la planificación y validación de programas de vigilancia y prevención de cáncer (Cassiani, 2011).

2.3.2.1. Micronúcleos en células de la mucosa bucal

El hecho de que un porcentaje muy elevado de los cánceres tenga un origen epitelial sugirió que el ensayo de MN en células epiteliales podría tener un enorme potencial epidemiológico (Pastor, 2002). Se ha descrito a la cavidad oral como el espejo que refleja la salud del individuo, cambios en la mucosa oral pueden revelar condiciones sistémicas, como la diabetes, deficiencia vitamínica, y efectos secundarios de tratamientos como la terapia contra el cáncer (quimioterapéuticos y radioterapia) y del consumo de tabaco o alcoholismo (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

Los tejidos epiteliales son muy proliferativos y muchos están en continuo contacto con el medio. A diferencia de otros tipos celulares, el epitelio está formado por varias capas de células que se van exfoliando a medida que alcanzan la superficie, por lo que el daño genético que vamos a detectar es el que ha ocurrido en las capas basales, el lugar en donde las células se han dividido. La rápida renovación de los tejidos epiteliales hace que el máximo índice de formación de MN aparezca entre 1 y 3 semanas después de la exposición al agente genotóxico (Motgi *et al.*, 2014), que será el tiempo necesario para que las células migren desde las capas basales del epitelio hasta la superficie (Pastor *et al.*, 2003).

Los cambios citogenéticos en estos tejidos son difíciles de estudiar por métodos tradicionales (CA o SCE), ya que se necesita tener metafases. Para solucionar este problema se deben utilizar técnicas citogenéticas que permitan hacer el análisis en interfase, como ocurre con la técnica de MN. Este ensayo es de los pocos disponibles para analizar alteraciones citogenéticas tempranas en tejidos epiteliales.

En 1983, Stich y Rosin adaptaron la metodología del ensayo de MN de linfocitos a células de exfoliación de la mucosa bucal (Stich y Rosin, 1983) para evaluar los efectos genotóxicos de la exposición al tabaco. Estos autores postularon que este sistema se podía utilizar para evaluar los efectos genotóxicos en todos los tejidos de los que se pudieran obtener células de exfoliación. La utilización de células epiteliales en el análisis de MN fue reforzada por Van Pelt colaboradores (1991) y, desde entonces, el ensayo se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de células para medir los efectos genotóxicos de exposiciones ambientales y ocupacionales. Pronto comenzaron a aparecer estudios con células de mucosa nasal, bronquiales, de vejiga urinaria y cuello del útero (Pastor, 2002, Kashyap y Reddy, 2012).

El estudio de MN de mucosa bucal tiene la ventaja de que se realiza directamente sin la elaboración de cultivos (González y Gómez-Meda, 2006). Los MN observados en células exfoliadas de tejido epitelial se forman en las células de la capa basal que es donde se lleva a cabo la división celular, éstas migran a la superficie en el transcurso de cinco a catorce días, de tal suerte que el monitoreo de poblaciones mediante la observación de este tejido puede reflejar el daño ocurrido durante este tiempo (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013), la técnica es rápida, simple y las muestras son fáciles de obtener. Para realizar esta prueba, se requiere que la persona se enjuague la cavidad bucal; luego, se realiza un raspado de la parte interna de las mejillas y el material es esparcido sobre un portaobjetos limpio, donde se deja secar para después fijarlo y teñirlo. Las observaciones se hacen en un microscopio con objetivo de inmersión (González y Gómez-Meda, 2006).

Este tipo de células son excelentes candidatas, gracias a su alta sensibilidad a muchas sustancias peligrosas. Otra ventaja que poseen estas células es debido a su epitelio no queratinizado pueden colorearse con facilidad utilizando giemsa y eosina (Cassiani, 2011, Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013). Una propiedad más es que las células del epitelio de la mucosa bucal presentan abundante citoplasma y conservan el núcleo al momento de ser exfoliadas (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

La evaluación de MN en células exfoliadas de la mucosa bucal se ha convertido en un biomarcador útil del daño genético en humanos (Kashyap y Reddy, 2012).

Además de los micronúcleos en células exfoliadas, Tolbert y su grupo describieron en 1991 otras anormalidades nucleares que son fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de

diferenciación celular y son indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular, ya que las alteraciones más sugestivas en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo; dichas modificaciones consisten en cambios en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina. Estas anormalidades pueden distinguirse de células normales, ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo; entre ellas se encuentran la cromatina condensada, cariorrexis, núcleo picnótico, cariolisis, núcleo lobulado, presencia de células binucleadas. El mecanismo de formación o el significado biológico de cada una de estas anormalidades nucleares no está del todo esclarecido hasta el momento. Sin embargo, bajo condiciones patológicas o condiciones de exposición se observan altas frecuencia (Tolbert *et al.*, 1992, Torres-Bugarín *et al.*, 2013).

Esta información es fundamental para determinar el riesgo a padecer cáncer u otras alteraciones en poblaciones expuestas a determinados compuestos genotóxicos (Cassiani, 2011). Estas evidencias conllevan al desarrollo de programas de protección y vigilancia epidemiológica, para garantizar una disminución en el índice de morbilidad y mortalidad en esta área laboral.

2.4. Exposición ocupacional en el Centro de Bioactivos Químicos

El Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, tiene como misión el desarrollo de nuevas entidades moleculares biológicamente activas y utiliza para ese fin, en lo fundamental, materias primas nacionales como por ejemplo residuos de la cosecha de la caña de azúcar y otros reactivos. A partir del furfural, obtenido por hidrólisis ácida del bagazo y la paja de la caña de azúcar, se han logrado obtener representantes de los compuestos nitrovinilfuránicos con propiedades farmacológicas. Este centro ha registrado nacionalmente tres productos con el ingrediente activo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, denominado G-1, cuyas marcas son 1) Queratofural[®], ungüento oftálmico veterinario, para el tratamiento de enfermedades bacterianas y fungosas, 2) Vitrofur[®], esterilizante químico para la producción de vitroplantas y 3) Dermofural[®], ungüento, para el tratamiento de enfermedades dermatológicas de origen bacteriano y fungoso en humanos (Gaitán Placeres, 2006).

Este Centro realiza el proceso a ciclo completo (síntesis a comercialización) de estos ingredientes activos por lo que cuenta con un equipo de trabajadores de carácter multidisciplinario que se involucran en la síntesis, análisis y caracterización químico farmacéutica, fármaco y toxicológica así como su comercialización. Esto conlleva una población laboral ocupacionalmente expuesta a agentes con potencial de daño sobre la salud y en particular sobre el material hereditario.

2.4.1. Características particulares de la exposición

El procedimiento patentado en el CBQ para la obtención del ingrediente activo G-1 consiste en la bromación del 2-(2-nitrovinil)-furano (G-0) utilizando como solvente disulfuro de carbono. La deshidrobromación se realiza con piridina pura después que el exceso de solvente es eliminado por destilación. El licor obtenido, se diluye con alcohol etílico y por enfriamiento cristaliza el producto crudo que se separa por filtración; la purificación se realiza mediante adsorción sobre carbón activado en etanol, obteniendo por recrystalizaciones sucesivas el producto activo.

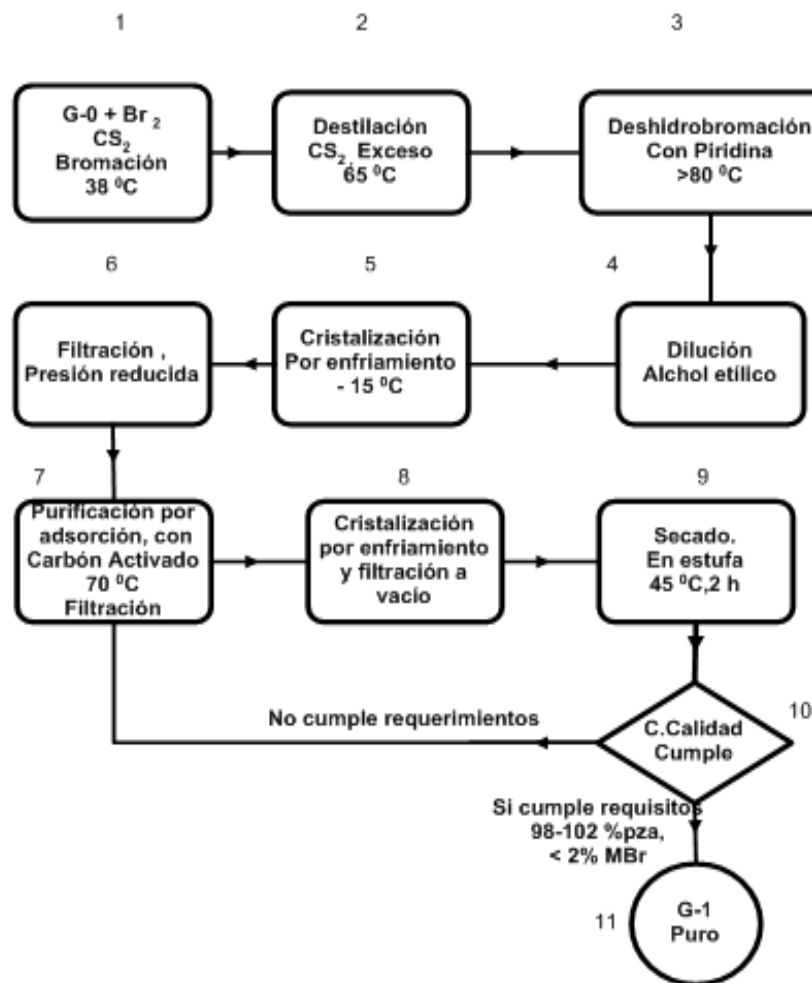


Figura 3. Esquema del procedimiento a escala de laboratorio para obtención de G-1. Tomado de (Gaitán Placeres, 2006).

El esquema del procedimiento a escala de laboratorio comprende once operaciones principales: 1- Bromación, 2-destilación, 3-deshidrobromación, 4-dilución, 5-cristalización, 6-filtración bajo presión reducida, 7-purificación mediante carbón activado y filtración, 8-cristalización por enfriamiento y filtración, 9-secado, 10-evaluación de la calidad y 11- envase del producto final (Fig. 3). En tal

manufactura se utilizan varias sustancias químicas y solventes y además se generan vapores de Br_2 y de $\text{HBr}_{(g)}$, con potencial toxicidad (Gaitán Placeres, 2006).

El producto G-0, constituye el intermediario para la obtención de G-1, pero además se le han patentado acciones como anticoccidiano y se han estudiado propiedades como inhibidores de la corrosión electroquímica y microbiana. Los métodos de síntesis del G-0 reportados hasta el presente, utilizan furfural, nitrometano y un catalizador básico (Rodríguez, 2007).

La elaboración del Vitrofural involucra un proceso de molinado del G-1 para obtener una dispersión sólida al 30% del principio activo en polietilenglicol 6000.

En la Tabla II se presentan los principales químicos a que están expuestos ocupacionalmente los trabajadores del CBQ.

Tabla II. Sustancias químicas utilizadas en el Centro de Bioactivos Químicos

Área	Sustancia Química	Proceso
Planta de Producción	Furfural	Obtención de G-0
	nitrometano	
	isobutilamina	
	Alcohol etílico	
	Carbón	
	G-0	
	Bromo	Obtención de G-1
	Piridina	
	Disulfuro de carbono	
	Anhidrido acético	
	Polietilenglicol 6000	
	G-1	Obtención de Vitrofural
Laboratorios de Análisis y control	Piridina	Análisis de pureza y estabilidad de G-1, G-0 y vitrofural
	Polietilenglicol 6000	
	G-1	
	G-0	
	Anhidrido acético	
	isobutilamina	

2.4.2. Efectos sobre la salud

Furfural

La exposición a esta sustancia tiene sobre todo conocidos efectos tóxicos agudos con síntomas inespecíficos acorde a la forma de exposición. La inhalación puede provocar tos, dolor de cabeza, dificultad respiratoria, jadeo y dolor de garganta. Por su parte la ingestión causa dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, irritación o quemaduras del esófago o del tracto gastrointestinal, dolor de garganta y vómitos. El contacto con ojos y piel puede provocar enrojecimiento y dolor (Gomez-Arroyo y Souza, 1985, 1995, Abraham *et al.*, 2011). No hay referencia de estudios subcrónicos, crónicos o genotóxicos, por lo que se carece de clasificación como mutágeno y se ubica en la categoría 3 como no cancerígeno para el ser humano

Nitrometano

El nitrometano puede ser absorbido por inhalación y por ingestión, causando efectos agudos tales como náuseas, vómitos, dolor de cabeza, debilidad, pérdida de coordinación y diarrea. El contacto con mucosas y piel puede irritar la piel secarla y agrietarla, irritar ojos, nariz, garganta, y vías respiratorias bajas causando tos y respiración con silbido. Puede llegar a irritar los pulmones. La exposición repetida podría causar daño hepático y renal.

Los altos niveles de esta sustancia pueden reducir la capacidad sanguínea de transportar oxígeno, causando cansancio, mareo y una coloración azulada en la piel y los labios (metahemoglobinemia). La exposición a muy altos niveles puede causar dificultad respiratoria, colapso e incluso la muerte. La exposición a largo plazo ha causado en animales cáncer glandular, renal y hepático (Mullins y Hammett-Stabler, 1998, IARC, 2000, NTP, 2010).

Isobutilamina

Este producto según su hoja técnica de seguridad del material, (OXEA, 2011) es altamente inflamable, sus vapores pueden formar una mezcla explosiva con el aire. Los componentes del producto pueden ser absorbidos por el cuerpo por inhalación, ingestión y a través de la piel siendo altamente tóxicos. Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares e irritación respiratoria. Derivados de la isobutilamina Nitrosodi-se citan como carcinogenos, con localización tumoral en cavidad nasal y tráquea (Lijinsky y Reuber, 1981).

Alcohol etílico

El alcohol es la droga más aceptada de nuestra sociedad y la más antigua de nuestra cultura. Sin embargo, es ampliamente tóxico para el organismo sea por consumo voluntario como por exposición ocupacional. La exposición aguda por contacto puede irritar la piel y los ojos, la inhalación puede irritar la nariz, la garganta y el pulmón, causando tos o falta de aire. También puede causar dolor de cabeza, náuseas, vómitos, pérdida del conocimiento y afectar a la concentración y la visión (Health, 2011).

La sobreingesta tiene repercusiones en todos los aparatos y sistemas: nervioso, cardiovascular, digestivo, sexual o a nivel de la médula ósea (Figuero *et al.*, 2004)

Hay referencias de que su ingestión podría aumentar el riesgo de ciertos cánceres (hígado, esófago, mama, próstata, colon, recto) en humanos. La exposición repetida a esta sustancia podría causar abortos espontáneos, así como malformaciones en recién nacidos y otros problemas en el desarrollo. Además existen indicios limitados de que la exposición al alcohol etílico podría disminuir la fertilidad masculina. El riesgo de padecer cáncer por exposición ocupacional al alcohol etílico no es concluyente.

Carbón

Los contaminantes del carbón afectan a los principales sistemas de órganos del cuerpo y contribuyen con cuatro de las cinco principales causas de mortalidad en los Estados Unidos: enfermedades cardíacas, cáncer, accidentes cerebro-vasculares y enfermedades crónicas del aparato respiratorio inferior (Lockwood *et al.*, 2009).

Según *op cit* cada paso del ciclo de vida del carbón – su extracción, transporte, lavado, combustión y desecho de residuos de postcombustión – tiene influencia sobre la salud humana. La combustión del carbón, en especial, contribuye con enfermedades que afectan a grandes sectores de la población de los Estados Unidos, incluyendo asma, cáncer de pulmón y accidentes cerebro-vasculares, agravando los principales problemas de salud pública de nuestros tiempos. Interfiere con el desarrollo pulmonar, incrementa el riesgo de infartos y compromete la capacidad intelectual.

Disulfuro de Carbono (D₂C)

El (D₂C) tiene conocidos efectos tóxicos, agudos y a largo plazo. Los efectos agudos se aprecian en funciones sistémicas y locales, irrita la piel y los ojos. Puede causar náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, sensación de desvanecimiento, desmayo e incluso la muerte

La exposición repetida puede causar cambios de personalidad, tales como depresión, ansiedad, irritabilidad, pérdida de la memoria y pérdida de la audición. Además provoca daño al hígado, riñón, y

corazón. También representa riesgo para la salud reproductiva, reduce la fertilidad en hombres y mujeres, causando anomalías espermáticas y abortos espontáneos. Puede ser un teratógeno en humanos, ya que lo es en los animales. En cambio su potencial carcinogénico no ha sido clasificado (ATSDR, 1997).

Bromo

El bromo es extremadamente corrosivo para los ojos, la piel, el árbol respiratorio y las membranas mucosas en forma de líquido o vapor, (van Leeuwen y Sangster, 1987, Sanidad, 2007b). Su inhalación puede causar secreción de las mucosas, tos, rinitis, epistaxis, sensación de opresión, vértigo y dolor de cabeza. Además de dificultad respiratoria, asma y disnea. Pueden aparecer síntomas no inmediatos como náuseas, diarrea y dolores abdominales. La inhalación de altas concentraciones puede causar lesiones inflamatorias de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, y quemaduras graves en los pulmones. La lengua y el paladar pueden aparecer inflamados y con edemas, presentando un olor característico en el aliento. Varias horas después de la exposición pueden manifestarse espasmos de la glotis, bronquitis asmática, edema pulmonar, y pulmonía *op cit.*

La ingestión puede causar quemaduras en la boca, garganta y estómago, corrosión y coloración marrón en lengua y membranas mucosas. Vómitos, dolor abdominal y diarrea pueden ser síntomas de una gastroenteritis corrosiva grave. Puede desencadenar hipotensión, taquicardia, cianosis y otros indicios de shock. La muerte puede ser debida a colapso circulatorio, asfixia por edema de la glotis, neumonía por aspiración o edema pulmonar.

El vapor concentrado en contacto con la piel es irritante o nocivo. El contacto directo con el líquido penetra rápidamente por el tejido produciendo erupciones, irritación y quemaduras químicas. El contacto con los ojos causa irritación, lagrimeo e inflamación. Pueden aparecer blefaro espasmos y fotofobia a altas concentraciones. Salpicaduras en los ojos pueden resultar en quemaduras graves.

La IARC no ha aportado datos sobre su carcinogenicidad ni evidencias de propiedades mutagénicas (Sanidad, 2007a).

Piridina

La inhalación de piridina puede irritar la nariz y la garganta, causando tos y respiración con silbido. Causa dolor de cabeza, náuseas, mareo, vómitos, diarrea, dolor abdominal e incluso coma y muerte. Es irritante para la piel y los ojos (Health, 2002)

No hay indicios de que la piridina cause cáncer en animales, aunque si se refieren riesgos en la organogénesis, daño hepático y renal *op cit.*

Anhidrido acético

El anhídrido acético, comúnmente abreviado Ac_2O , es uno de los anhídridos carboxílicos más simples pero más ampliamente usados en síntesis orgánica.

Los efectos sobre la salud se suceden luego de la inhalación, la ingestión y el contacto con la piel (Sanidad, 2008, Labbox, 2014).

La inhalación produce disnea, edema en las vías respiratorias superiores, y pulmonar, hipoxemia, broncoespasmos, neumonitis, traqueobronquitis y anormalidades persistentes en la función pulmonar.

La ingestión puede provocar dolor de garganta, sensación de quemazón, dolor abdominal y colapso.

En contacto con la piel ocasiona enrojecimiento, dolor, quemaduras y ampollas. El contacto con los ojos puede causar enrojecimiento, dolor y quemaduras graves, erosión corneal y ceguera.

Según la bibliografía consultada a la vista de los datos disponibles, no se cumplen los criterios de clasificación para este compuesto en cuanto a mutagenicidad, carcinogénesis, y teratogenicidad.

Polietilenglicol 6000

Esta sustancia no está clasificada como peligrosa, los mayores daños que podría causar, son el efecto laxante tras la ingestión de grandes cantidades de la misma, e irritación de ojos y piel en caso de contacto (Acofarma, 2010, GUINAMA, 2010, GTM, 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población estudiada

Se evaluaron trabajadores del CBQ en un estudio de casos y controles. Los trabajadores que accedieron a participar en el ensayo se distribuyeron en ambos grupos. Antes de la realización de cualquier procedimiento, los sujetos potenciales a incorporarse al estudio recibieron una explicación clara sobre los objetivos del estudio, el riesgo, los beneficios y el carácter voluntario de su participación. Los mismos manifestaron su consentimiento por escrito, el cual se basó en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y los reglamentos gubernamentales e institucionales ((WMA), 1964, CIOMS, 1993). El grupo caso incluyó los individuos expuestos ocupacionalmente y el grupo control se conformó con trabajadores cuyas funciones no implican interacción continua y directa en procesos de síntesis, análisis y manejo de sustancias químicas.

La selección de cada grupo estuvo determinada por la disponibilidad de voluntarios, y el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión, siendo excluidos aquellos con enfermedad oncológica, con tratamiento radioterápico o de quimioterapia, o que no respondieron al cuestionario.

El número total de individuos alcanzó la cifra de 39, divididos en 14 expuestos y 25 controles.

3.2. Cuestionarios

Paralelamente a la extracción de las muestras biológicas, y para tener un buen conocimiento de las características, tanto del colectivo expuesto como del control, cada donante se sometió a una encuesta exhaustiva (ver Anexo 1) con el fin de obtener información, lo más detallada posible sobre su actividad laboral y sus antecedentes personales. Se realizaron las preguntas habituales sobre demografía (edad, sexo, lugar de residencia,...), preguntas relacionadas con su historial médico (enfermedades, anomalías genéticas, medicación, antecedentes familiares de cáncer, abortos espontáneos,...), con la ocupación previa y actual, actividades de ocio, dieta, hábitos de consumo (alcohol, tabaco, café, drogas), exposiciones peligrosas (RX, productos cancerígenos, etc.), y cualquier otro factor que pudiera inducir daño genotóxico o interaccionar con la exposición. Los trabajadores tuvieron que responder, además, a una serie de preguntas relacionadas medidas de protección y seguridad en su puesto de trabajo.

El objetivo de la encuesta es detectar cualquier factor que pueda crear confusión con los resultados obtenidos.

3.3. Ensayo de MN en mucosa bucal

3.3.1. Obtención y preparación de las muestras

Antes de obtener las muestras, cada donante se enjuagó la boca con agua destilada estéril para eliminar posibles restos de alimentos.

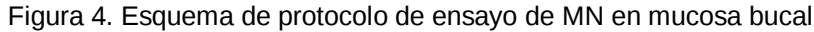
Las células de descamación de la mucosa bucal se obtuvieron friccionando el interior de las mejillas, evitando tocar la lengua y los dientes, con hisopo o cepillo dental de fibra suave humedecido en solución salina fisiológica. Estas muestras fueron inmediatamente sumergidas en 15mL de solución salina fisiológica agitando vigorosamente para obtener el mayor número posible de células. Las muestras fueron mantenidas a 4 grados hasta su posterior procesamiento.

3.3.2. Protocolo

Las muestras de mucosa bucal se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 15 ml de solución tampón (0,1M EDTA, 0,01M tris-HCl, 0,02 M NaCl, pH = 7), se centrifugó durante 10 minutos 1500 rpm, repitiendo este paso hasta tres lavados. Acabado el tercer lavado, se aspiró el sobrenadante y se adicionó solución fijadora de Carnoy (Acido Acético: metanol 1:3) fría por 5 min, se centrifugó dejando una cantidad suficiente de tampón para tener una concentración celular adecuada (Titenko-Holland *et al.*, 1998). Se gotearon 6 gotas de 50µL del botón celular sobre portaobjetos (2 por muestra) calentados en una placa calefactora a 55°C durante 15 min y se dejaron secar durante otros 15 min en la placa calefactora. Una vez que estaban bien secas, se guardaron a -20°C hasta su evaluación.

Las preparaciones secas se tiñeron con una solución al 10% de Giemsa durante 10 minutos. Después de lavadas (con agua de la llave) se secaron al aire, y una vez secas se sellaron con cubreobjetos (24 x 60 mm) utilizando Entellan. Los portaobjetos, fueron codificados previamente, ya que mediante el estudio “a ciegas” se evita subjetividad en el análisis. La observación se hizo con aumento de 1000 X con ayuda de un microscopio de campo claro (Fig. 4).

El número de células con MN por individuo se obtuvo del conteo de 1000 células. Para considerar que estábamos en presencia de MN seguimos los criterios de Tolbert (Tolbert *et al.*, 1992), debía cumplirse que el diámetro de los mismos fuera menor de 1/3 del tamaño de los núcleos, que la coloración fuera semejante a la de los núcleos principales y que el MN estar totalmente separado o solo superponerse parcialmente a uno de los núcleos principales.



Se hizo la estadística descriptiva de las diferentes variables demográficas y de estilos de vida tanto para población total como para los grupos: casos y controles.

Para determinar los factores de riesgos asociados con la incidencia de micronúcleos por grupo se usó la técnica de árbol de decisión CHAID (Chi-squared Automatic Interaction Detector) basado en el estadígrafo chi-cuadrado. En este estudio se consideraron como factores de riesgos, la edad, sexo,

ocupación, años de exposición ocupacional, riesgos en puesto de trabajo actual y previo, lugar de residencia y riesgos asociados a este y a estilos de vida: consumo de alcohol, tabaco café, dietas, agua enfermedades, antecedentes familiares, etc. Todos los análisis estadístico fueron realizados con el SPSS, versión 20 y se consideró un nivel de significación de $\alpha = 0.05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Las características descriptivas de ambos grupos para diferentes variables demográficas, de estilos de vida y datos personales extraídos de la encuesta se presentan en la Tabla III.

Tabla III. Caracterización demográfica y de estilos de vida de la población.

Características		Control n=25 (%)	Expuesto n=15 (%)	Total N=39	p
Edad (media)		42.21 ± 4.52	42.50 ± 6.87	42.32 ± 3.62	NS
Sexo	Femenino	16 (64.0)	10 (71.4)	26 (66.7)	NS
	Masculino	9 (36.0)	4 (28.6)	13 (33.3)	
Color de piel	Blanca	22 (88)	12 (85.7)	34 (87.2)	NS
	Mestizo	2 (8)	0 (0)	2 (5.1)	
	Negra	1 (4)	2 (14.3)	3 (7.7)	
Consumo de medicamentos	No consumo	9 (36)	5 (35)	14 (35.9)	NS
	Consumo	16 (64)	9 (64)	25 (64.1)	
Consumo de tabaco	Fumador	2 (8)	0 (0)	2 (5.1)	NS
	No fumador	14 (56)	10 (71.4)	24 (61.53)	
	Fumador pasivo	8 (32)	2 (14.3)	10 (25.64)	
	Ex fumador	1 (4)	2 (14.3)	3 (7.8)	
Consumo de alcohol	Si	8 (32)	8 (57.1)	16 (41)	NS
	No	17 (68)	6 (42.9)	23 (59)	
Consumo de embutidos	Si	23 (92)	8 (57.1)	31 (79.5)	0.01
	No	2 (8)	6 (42.9)	8 (20.5)	
Consumo de carne roja	Si	12 (48)	1 (7.1)	13 (33.3)	0.009
	No	13 (52)	13 (92.9)	26 (66.7)	
Consumo de pescado	Si	7 (28)	12 (85.7)	19 (48.7)	0.001
	No	18 (72)	2 (14.3)	20 (51.3)	

Tabla III. Continuación

Área ocupacional	Biológica	15 (60)	0 (0)	15 (38.5)	<0.001
	Química	10 (40)	7 (50)	17 (43.6)	
	Planta de Producción	0 (0)	7 (50)	7 (17.9)	
Exposición en residencia					
Si (P , AT, PR, Q)		4 (16)	7 (50)	11 (28.2)	0.024
No		21 (84)	7 (50)	28 (71.8)	
Antecedentes	No	17 (68)	6 (42.9)	23 (59)	NS
cáncer	Si	8 (32)	8 (57.1)	16 (41)	

P (plaguicidas), AT (alta tensión), PR (planta de residuales), Q (químicos) NS (No hay diferencias significativas)

La edad tuvo una media, para el total de la población de 42.32 años; y de 42.21 ± 4.52 y 42.50 ± 6.87 para controles y expuestos. Hubo un predominio del sexo femenino en ambos grupos, 64% para los controles y 71.4 % para los expuestos. El 87.2% de los individuos son blancos, la mayoría son no fumadores (92% en los controles y 100 % en los expuestos). El 41% de la población analizada es consumidora casual de alcohol e igual porcentaje presenta antecedentes familiares con algún tipo de cáncer, ya sea pulmón, próstata, útero y mayoritariamente de mama. El grado de parentesco reportado fue en abuelos y abuelas, tías y madre.

Como se aprecia no hubo diferencias significativas entre los grupos en relación a la edad, el sexo, el color de la piel, el hábito de fumar y de consumir alcohol, así como en los antecedentes familiares de cáncer. Igualmente no se hallaron diferencias en cuanto a consumo de agua de diversas fuentes, enfermedades, uso de medicamentos y riesgos asociados a actividades de ocio (datos no mostrados, ver Anexo2).

Los años de ocupación en el puesto de trabajo actual tuvieron una media de 11.63 ± 4.53 y 12.71 ± 6.15 para el control y el expuesto, respectivamente; por lo que esta variable no resultó de interés estadístico. Así mismo los años de trabajo en ocupaciones previas tampoco exhibieron diferencias entre los grupos.

En relación a los estilos de vida solo se hallaron diferencias entre los grupos, en la dieta, particularmente en el consumo de carne, pescado y embutidos.

De lo anterior se infirió que estudiamos una población bastante homogénea respecto a variables “confusoras” para estimar el riesgo asociado a una exposición ocupacional.

En cambio detectamos diferencias significativas entre los grupos relacionadas con el riesgo en el área ocupacional, el 50 % de los expuestos pertenecían al Departamento químico y el otro 50 % a la

Planta de producción, mientras que el control estuvo conformado en un 60 % por trabajadores del Departamento biológico y un 40 % por trabajadores de oficina del Departamento Químico. Esta variable resultó ser diferente con significación estadística, lo que motivó a profundizar en el análisis de variables asociadas a la exposición, los resultados de este análisis se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Caracterización de riesgo ocupacional de la población estudiada.

Características		Control	Expuesto	Total	<i>p</i>
Tamaño de muestra		n=25 (%)	n=14 (%)	n= 39 (%)	
Exposición ocupacional	Si	19 (76)	14 (100)	33 (84.61)	0.04
	No	6 (24)	0 (0)	6 (15.38)	
Años de trabajo		11.63 ± 4.53	12.71 ± 6.15	12.17	NS
Ocupación actual					
Grado de riesgo	Bajo	23 (92)	1 (7.1)	24 (61.53)	<0.001
	Moderado	2 (8)	5 (25.7)	7 (17.94)	
	Alto	0 (0)	8 (57.1)	8 (20.51)	
Exposición Químicos	Si	17 (68)	14 (100)	31 (79.48)	0.018
	No	8 (32)	0 (0)	8 (20.51)	
Polvo	Si	5 (20)	8 (57.1)	13 (33.33)	0.018
	No	20 (80)	6 (42.9)	26 (66.66)	
Derivados del carbono	Si	1 (4)	8 (57.1)	9 (23.07)	<0.001
	No	24 (96)	6 (42.9)	30 (76.92)	
Años de trabajo		8.88 ± 4.96	5.43 ± 3.78	7.15	NS
Ocupación previa					
Grado de riesgo previo	Alto	7 (28)	2 (14.3)	9 (23.07)	0.024
	Moderado	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Bajo	18 (72)	12 (85.7)	30 (76.92)	

NS (No hay diferencias significativas)

La exposición ocupacional resultó una variable con diferencias estadísticas de significación, porque aunque los controles presentaron un 76% de sus casos con cierto grado de exposición a factores de riesgo de diversa naturaleza, el 100% de los individuos del grupo de exposición estuvieron en interacción con sustancias riesgosas.

Este resultado se corrobora cuando se estratifican los grupos por grado de riesgo y, se detectan diferencias altamente significativas, el 92 % de los controles se consideraron de riesgo bajo, según

número de sustancias que manipulan volúmenes y frecuencia de uso; por el contrario en el grupo expuesto el 57.1% está considerado como población con alto riesgo. Al desglosar los riesgos por su naturaleza se hallaron diferencias significativas entre controles y expuestos en relación a sustancias químicas, polvos y derivados del carbono, siendo esta última variable la que más peso tuvo en la diferencia. Un resultado interesante es el grado de riesgo en ocupaciones previas donde también se detectaron diferencias pero en este caso los controles resultaron tener el mayor porcentaje de individuos con alto riesgo (28%), y los expuestos tan solo un 14.3%.

El desarrollo de este trabajo permitió la identificación de aberraciones cromosómicas en células epiteliales de la mucosa bucal de los participantes.

Las anomalías encontradas fueron micronúcleos (MN), células con yemas nucleares, puentes nucleoplasmáticos, células binucleadas, cariorrexis y cromatina condensada (Fig. 5). Estas últimas están estrechamente relacionadas con la citotoxicidad siendo solo cuantificadas las células micronucleadas como biomarcador de daño genético.

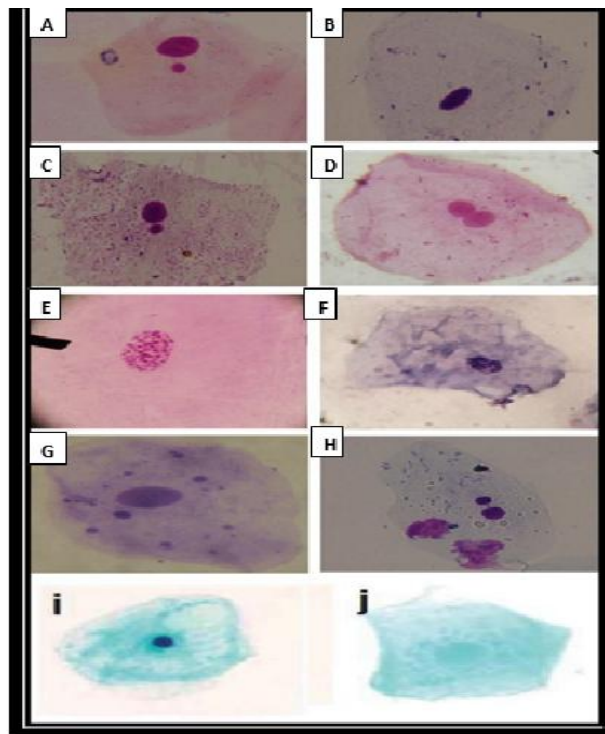


Figura 5. Células de mucosa bucal teñidas con Giemsa al 10 %: A) Célula con micronúcleo (MN); B) Célula normal; C); Célula con yema nuclear D) célula binucleada; E) célula con cariorrexis; F) cromatina condensada; G); fragmentación nuclear H) Célula con puente nucleo plasmático: I) Célula con núcleo picnótico; J) Célula con cariolisis. Microscopio Binocular compuesto. Imágenes capturadas a 400 y a 1000 aumentos reales.

La prueba no paramétrica de Mann-Whitney de muestras independientes mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los valores de MN en 1000 células para el control y el expuesto. La media de micronúcleos para el control fue de $5,96 \pm 2,47$ mientras que para el expuesto fue de $10,79 \pm 2,65$ (Fig. 6).

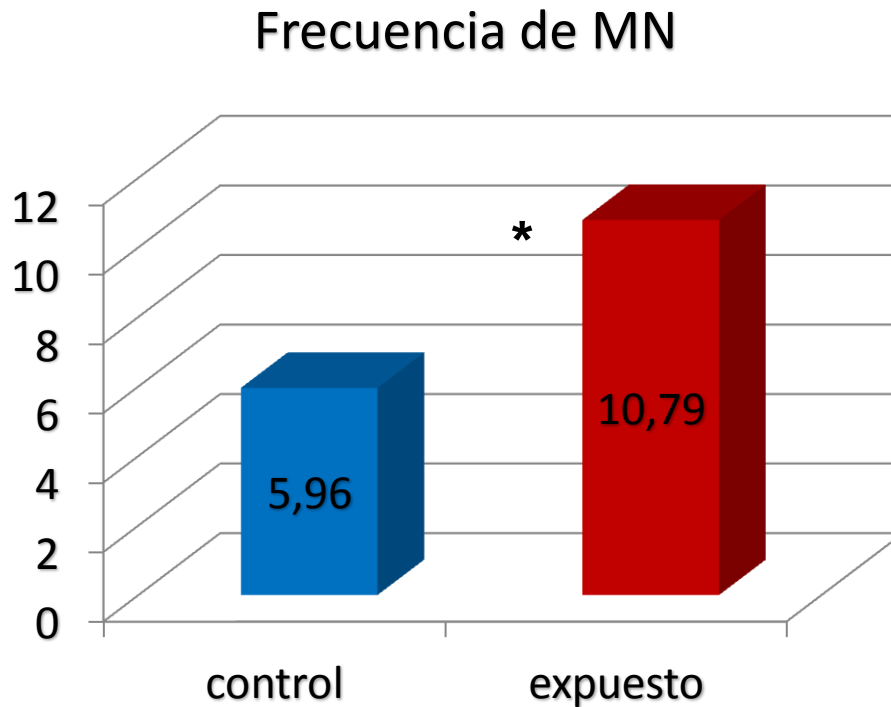


Figura 6. Frecuencia media de MN para el control y el expuesto.

El análisis de la asociación de factores de riesgo con la incidencia de micronúcleos a través de la técnica de árbol de decisión CHAID permitió determinar un valor de corte para la variable número de micronúcleos, que definió dos niveles para esta población: baja incidencia y alta incidencia de micronúcleos. El valor de corte 7 resultante (Anexo 3) fue usado para encontrar nuevas asociaciones entre la variable micronúcleos discretizada (bajo/alto nivel de micronúcleos) y los factores de riesgos. Este valor tiene sentido biológico pues coincide con el valor referido como frecuencia normal para las poblaciones humanas (Bonassi *et al.*, 2001).

Cuando fueron consideradas todas las variables en el análisis resultó que la incidencia de micronúcleos se asoció significativamente con la variable grupo ($p < 0.001$). El primer nodo del árbol (nodo 0) indica que de los 39 casos estudiados, 21 tiene una incidencia de micronúcleos por debajo de 7, y los restantes 18 tienen una frecuencia superior a 7. En el grupo expuesto el 85.7 % de los casos exhiben mayor incidencia de micronúcleos, por el contrario el 76 % de los del grupo control

presentan menor incidencia de micronúcleos (Fig. 7). Este resultado confirma la buena asignación de los individuos a los grupos de estudio. Una asociación interesante que se halló en el análisis de este árbol fue la asociación significativa entre la incidencia de MN en grupo control con el grado de riesgo en la ocupación previa, los individuos controles que antes ocuparon puestos de riesgos exhibieron más células micronucleadas que sus homólogos de grupo pero no expuestos con anterioridad.

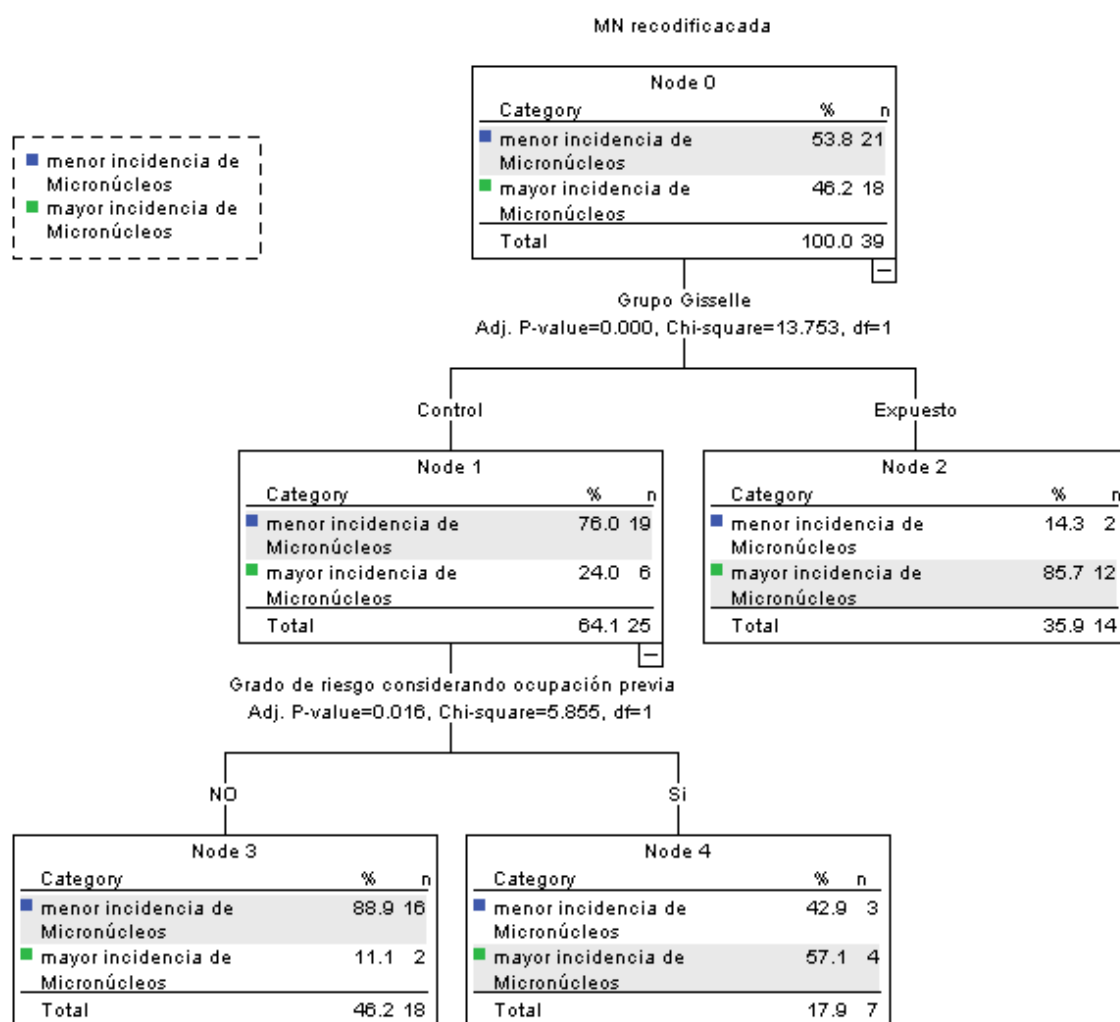


Figura 7. Árbol de decisión considerando todas las variables.

La siguiente asociación significativa ($p < 0.05$) que se encontró fue entre la frecuencia de micronúcleos y el tipo de riesgo actual. Cuando el grupo estaba expuesto a riesgo biológico por trabajar en esa área de investigación el 6.7 % de los casos presentó alta incidencia de MN, cuando se trató de trabajadores del área química el 58.8% presentó alta incidencia de MN. El mayor porcentaje de individuos con frecuencia de MN por encima de 7 fue en aquellos que laboraban en la planta de producción (100%) (Fig. 8).

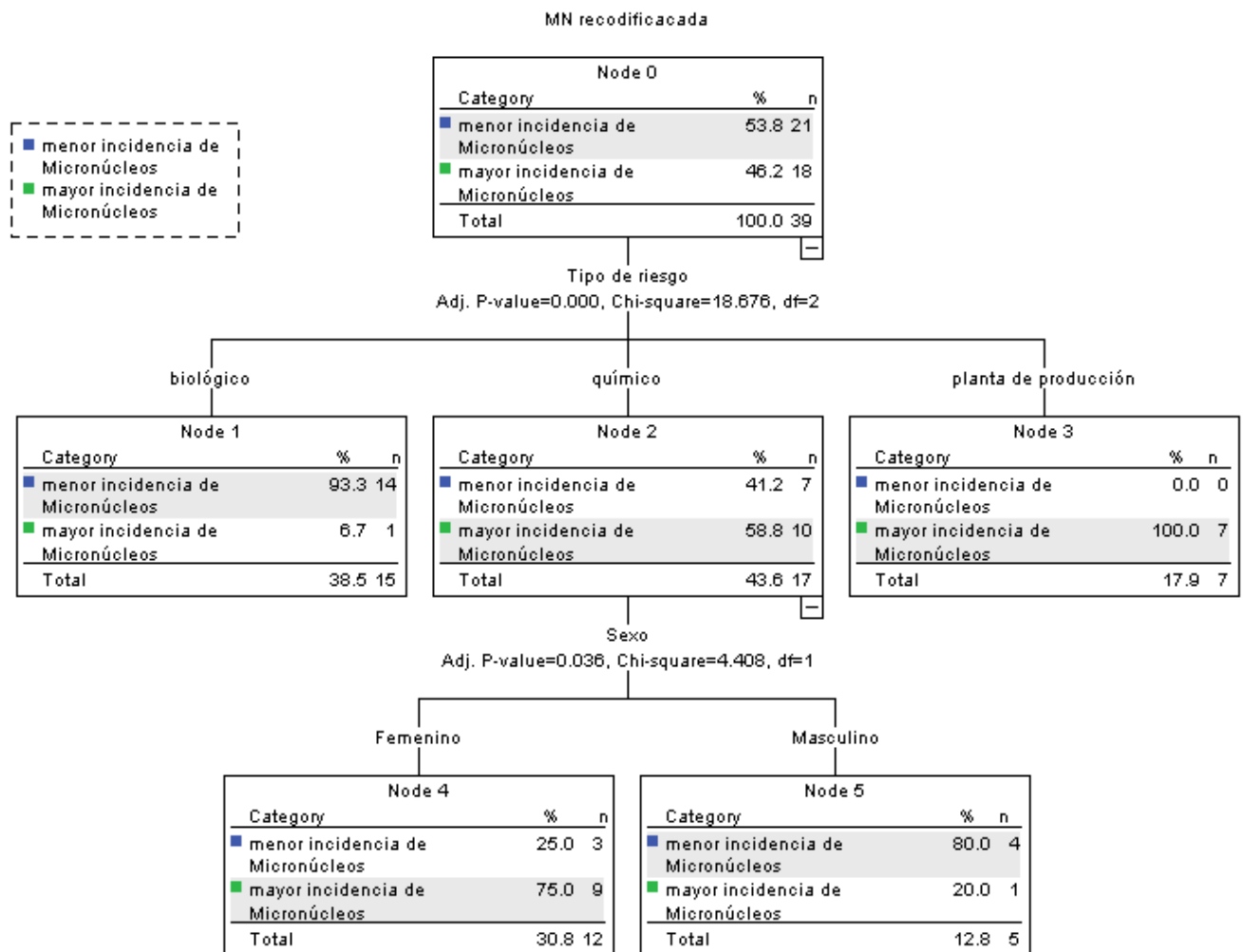


Figura 8. Árbol de asociación entre frecuencia de MN y tipo de riesgo

Del nodo 2 de este árbol se derivó otra asociación significativa ($p=0.03$) entre los trabajadores del área química y el género, apreciando una mayor frecuencia de MN en las mujeres 9/12 para un 75% (Fig. 8).

Este resultado fue confirmado para todos los trabajadores, independientemente del área pues en el Nodo 0 del árbol presentado en la Figura 9 se apreció una asociación significativa entre la

frecuencia de MN y el sexo ($p= 0.04$). El 57.7 % de las personas con mayor número de células micronucleadas eran mujeres.

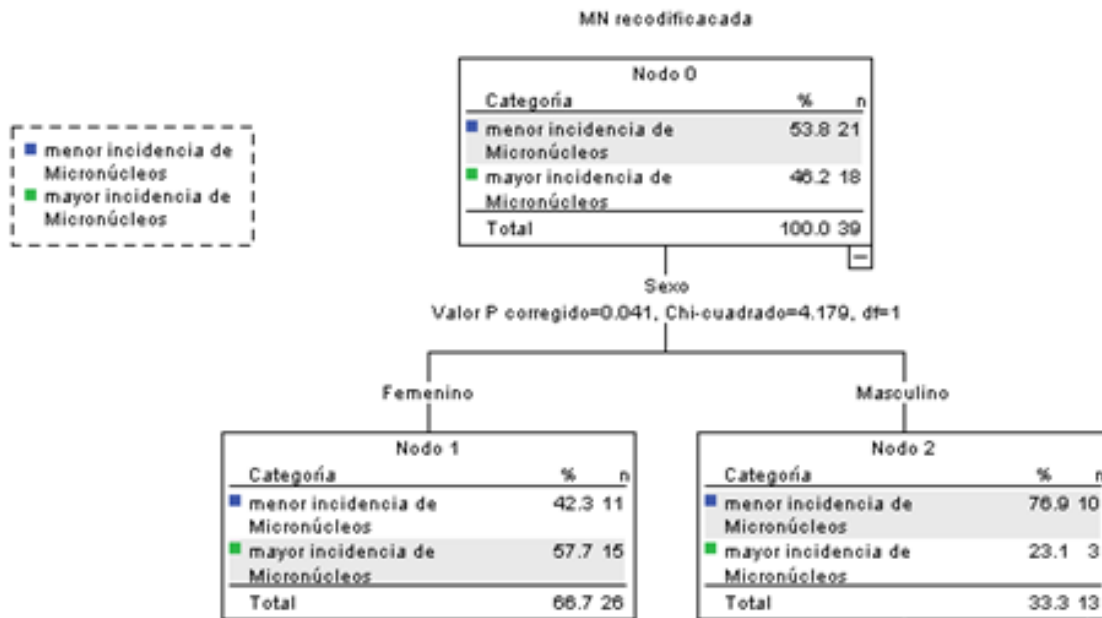


Figura 9. Árbol de asociación entre frecuencia de MN y sexo

La exposición a derivados del carbono fue el tipo de riesgo que más significativamente se asoció con el incremento de MN, hallando que el 88.9 % de los casos con mayor incidencia de MN estuvieron expuestos a estos (Fig.10).

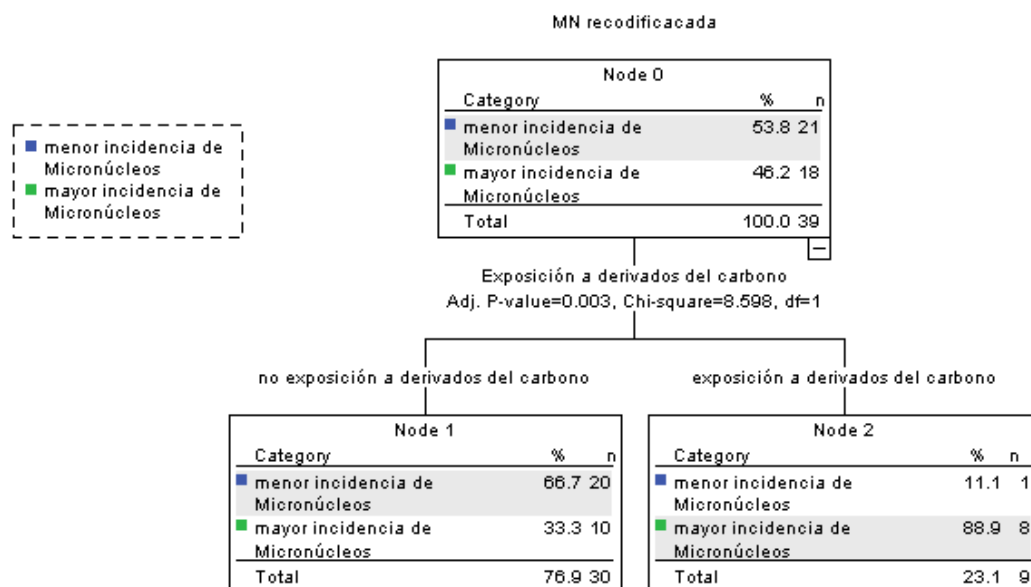


Figura 10. Árbol de asociación entre frecuencia de MN y exposición a derivados del carbono

Las sustancias pulverizadas de carbono u otra naturaleza también influyeron significativamente en la frecuencia del daño genético estudiado puesto que el 76.9% de los expuestos tuvieron mayor frecuencia de células micronucleadas (Fig. 11). Interesantemente dentro de este grupo los que mayor frecuencia de MN tuvieron fueron los que consumieron más pescado.

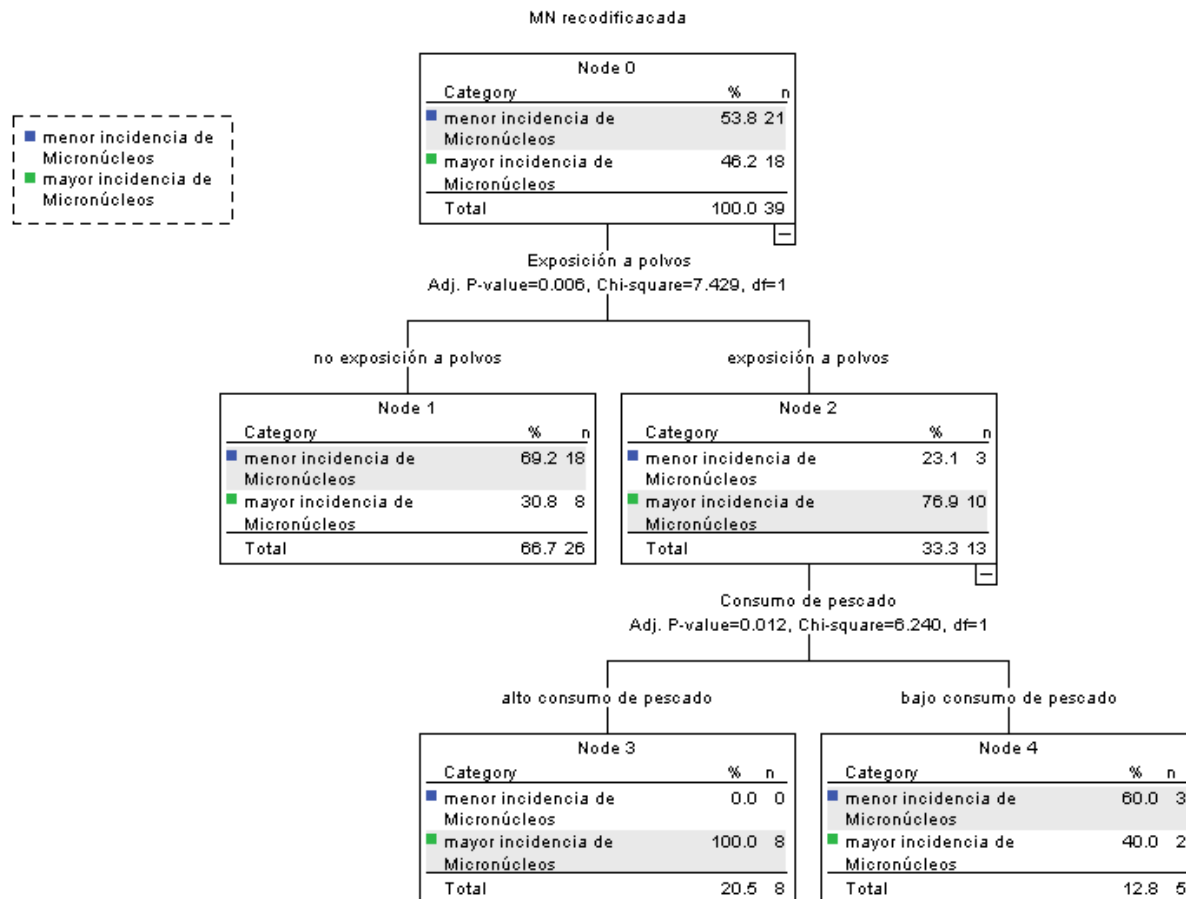


Figura 11. Árbol de asociación entre frecuencia de MN y exposición a químicos pulverizados

Otra relación significativa entre el evento genético y los estilos de vida se halló en el árbol que estudió la asociación con consumo de carne rojas semanalmente, donde la mayor frecuencia de MN fue en individuos con menor consumo de carne y que a su vez estaban más expuestos a vegetales o frutas que fueron tratadas químicamente con sustancias “maduradoras” (Fig.12).

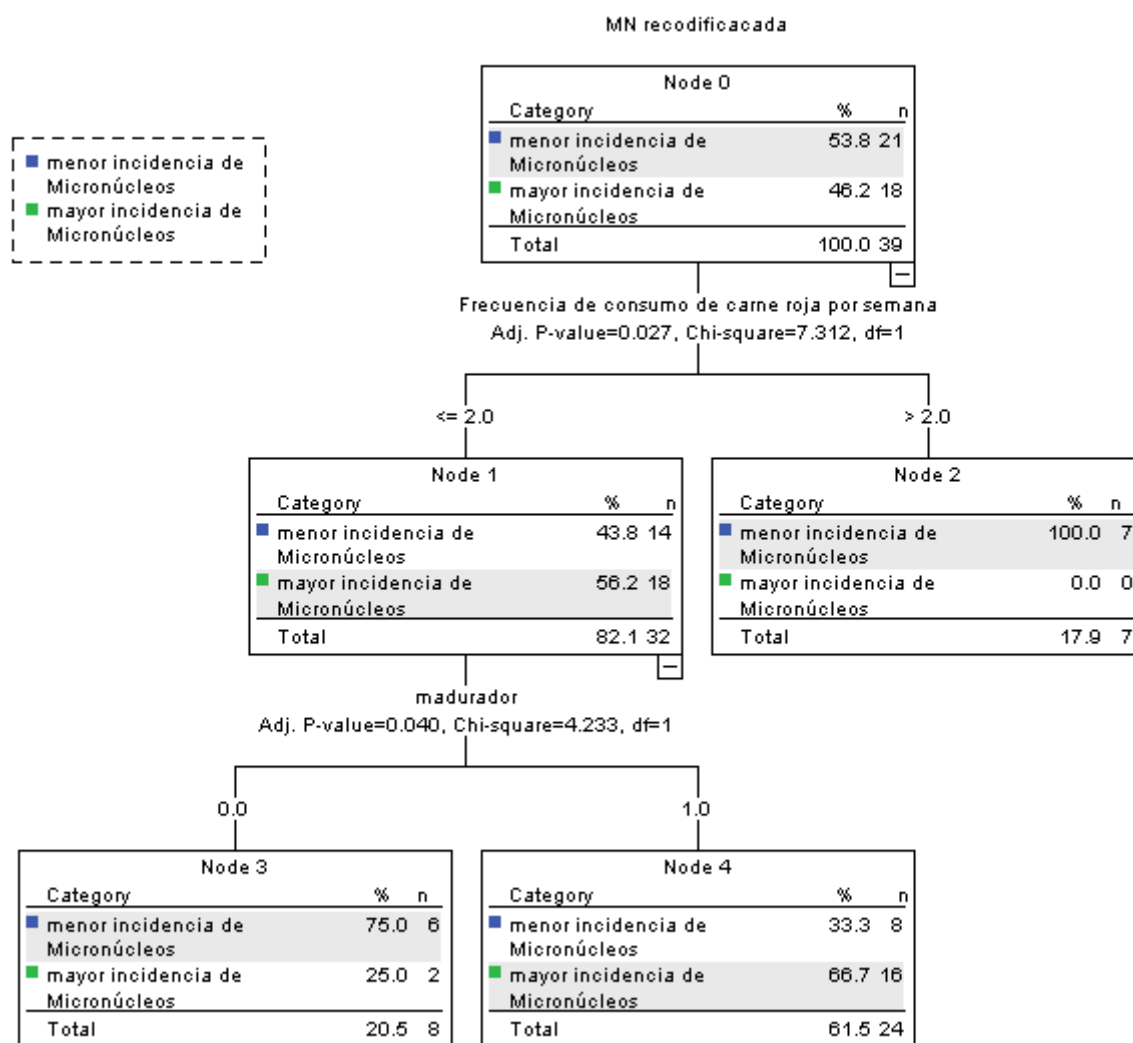


Figura 12. Árbol de asociación entre frecuencia de MN y estilos de vida

Todos estos resultados fueron corroborados usando tablas de contingencia y como estadígrafo Chi-cuadrado. Fueron halladas asociaciones de significación estadística entre la incidencia de micronúcleos y las variables: grupo, grado de riesgo actual, tipo de riesgo, sexo, exposición a polvos y exposición a derivados del carbono.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El propósito de esta tesis se aviene con el creciente interés por la salud ocupacional. Los estudios de biomonitorización genética de poblaciones humanas laboralmente expuestas a diferentes agentes constituyen en la actualidad el centro de numerosas investigaciones (Gil y Hernandez, 2015, Singaravelu y Sellappa, 2015).

Hoy es reconocido que la presencia de células con MN se asocia con defectos genéticos, que pueden subyacer en procesos como el envejecimiento temprano, carcinogénesis y enfermedades degenerativas (Benítez-Leite *et al.*, 2010). Esto contribuyó a la elección de los MN, usando linfocitos de sangre periférica, como marcador citogenético (Basu *et al.*, 2004). No obstante el origen epitelial de más de un 90% de los cánceres sugirió la factibilidad del estudio de MN en células exfoliadas como un marcador sensible, y mínimamente invasivo, propiciando la propuesta del ensayo de MN en células epiteliales como herramienta para el biomonitoreo epidemiológico (Pastor, 2002).

El ensayo de MN se ha erguido como uno de los ensayos más robustos y populares para evaluar daños citogenéticos. El proyecto establecido en 1997 y publicado en 2001, Human micronucleus (HUMN) (<http://www.huMN.org>), y el más reciente lanzamiento, en 2007, del proyecto con células exfoliadas de mucosa bucal, HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)) ([http://www.huMN\(xl\).org](http://www.huMN(xl).org)), confirman el interés internacional en establecer un programa conjunto que incremente el conocimiento del ensayo y que promulgue la creación de una red de laboratorios que estudien el riesgo de enfermedades asociadas a la frecuencia de MN y la correlación con la exposición ambiental u ocupacional (Bonassi *et al.*, 2011, Fenech *et al.*, 2011). Este ensayo ha demostrado ser una herramienta importante para identificar las causas de los efectos genotóxicos relacionados con factores de estilo de vida, hábitos alimenticios, diferentes enfermedades, edad, sexo y grupos étnicos (Ceppi *et al.*, 2011).

Este quehacer ha resultado en un incremento en las dos últimas décadas de la aplicación del ensayo de micronúcleos para evaluar daños en el ADN de personas expuestas a agentes mutágenos (Bortoli *et al.*, 2009). Los datos compilados de diversos laboratorios han permitido la conformación de una línea base de las frecuencias de micronúcleos hallados en diferentes ambientes, la cual tiene el siguiente rango (0,05 – 11,5 MN/1000 células), donde la mayoría de los valores oscilan entre 0,5 y 2,5 MN/1000 células (Holland *et al.*, 2008).

Los valores medios de células con MN en nuestro estudio están dentro del rango de la línea base referenciada (Bonassi *et al.*, 2001, Neri *et al.*, 2005, Ceppi *et al.*, 2011), incluso cuando el grupo expuesto presenta aproximadamente el doble de células con MN, lo cual implica un incremento significativo respecto al grupo control. Es oportuno mencionar que aunque el fin de esta tesis no

concibió la cuantificación de otras anomalías nucleares, observamos: cariorrexis, núcleo picnótico, cariólisis gemación nuclear, células binucleadas y con cromatina condensada, que además de ser fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, son indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular (Carlin *et al.*, 2010). El mecanismo de formación o el significado biológico de cada una de estas AN no está muy bien esclarecido, sin embargo, bajo condiciones patológicas diferentes tipos de cáncer, problemas hematológicos (Torres-Bugarin, 2000) o de exposición (tabaco, alcohol, drogas y quimioterapia antineoplásica); se observan altas frecuencias de células con AN. Así, las células con doble núcleo podrían ser un marcador importante de falla en la citoquinesis causada por una frecuencia anormalmente elevada de aneuploidia. La significancia biológica de las células picnóticas y el mecanismo de formación son desconocidos, y puede representar un mecanismo alternativo de desintegración nuclear, diferente a la cariorrexis y la cromatina condensada (Tolbert *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 2008, Benítez-Leite *et al.*, 2010). El interés por comprender los mecanismos que subyacen en estas AN catalizará su afianzamiento como biomarcador de citotoxicidad y de alerta genética, muestra de ello es la implementación del ensayo Buccal Micronucleus Cytome assay (por sus siglas en inglés) que analiza desde las células basales hasta las exfoliadas de este tejido epitelial (Thomas y Fenech, 2011).

Nuestros resultados son difíciles de contrastar con experiencias previas pues carece de precedentes homólogos ya que las condiciones de exposición son particulares en el CBQ, El centro posee las patentes de síntesis y acciones biológicas, la tecnología y la licencia de producción de esas moléculas y de algunas de sus formulaciones. Es cierto que se manejan durante la manufactura varias sustancias, de uso frecuente en laboratorio y la industria química, clasificadas en función de su potencial carcinogénico o teratogénico (IARC, 2000, Lockwood *et al.*, 2009), pero otras carecen de caracterización para su capacidad de dañar el ADN. Lo que es más interesante y a la vez preocupante es que son casi nulos los estudios epidemiológicos de sus riesgos por exposiciones ocupacionales prolongadas o, el impacto que provoca la sinergia de ese conjunto de reactivos.

En los casos de exposiciones combinadas ya no se han de atribuir los efectos a un grupo específico de químicos, puesto que no se pueden descartar las interacciones entre los mismos. Es muy factible que esta interacción cambie la respuesta que se produciría si los componentes de tales mezclas actuaran de manera individual (Burkart y Jung, 1998, Lucero *et al.*, 2000) que es como se los evalúa para definir su toxicidad. Además, a diferencia de los experimentos llevados a cabo en animales, las exposiciones humanas no ocurren, evidentemente, bajo situaciones controladas, con lo cual se explica la falta de categorización de los compuestos respecto a su genotoxicidad /carcinogenicidad en el hombre, referidos al cual, los resultados quedan catalogados como “poco concluyentes”. A pesar de estos sesgos existen varios estudios epidemiológicos de asociación entre solventes orgánicos de

uso en ambiente laboral y cáncer (Lynge *et al.*, 1997, Dominguez Odio *et al.*, 2005, Glass *et al.*, 2015).

Para los estudios de asociación se estratificó la población en función de un criterio estadístico y biológico que indica que 6.5 es el valor medio de la frecuencia de MN en las poblaciones humanas (Bonassi *et al.*, 2001). El daño genotóxico (frecuencia de MN) se correlacionó positiva y significativamente ($p < 0.001$) con la variable grupo, donde el 85.7% de los individuos expuestos mostraron frecuencia de MN por encima de 7, estando la frecuencia media en 10.79. Estudios realizados por Gómez – Arroyo y col (2000), han encontrado un incremento de la frecuencia de MN en células de mucosa bucal en poblaciones expuestas a sustancias químicas, estos autores encontraron niveles de MN por 1000 células de 3.8 MN en controles y 10 MN en expuestos, similares a los encontrados en este trabajo, sin embargo otros autores detectan frecuencias más bajas de 2.16 MN en controles y 4.75 MN en expuestos por 1000 células (Diaz *et al.*, 1990, Larrea, 2007).

Otra asociación significativa de este estudio es la que existe entre frecuencia de MN y tipo de riesgo según el área de ocupación actual, la menor incidencia de MN fue en el grupo expuesto a riesgo biológico (grupo 1) por trabajar en experimentación biológica donde tienen baja e infrecuente exposición a químicos, lo siguió la población del área química (grupo 2), donde el 58.8% presentó una alta incidencia de MN puesto que el 50 % de este grupo eran trabajadores de oficina que conformaron el grupo control, y finalmente todos los individuos (100%) que laboraban en la planta de producción tuvieron frecuencia de MN por encima de 7 (grupo 3). Estos últimos son los que mayor grado de exposición a sustancias químicas debido a que sobre ellos recaen las principales labores de manufactura de los principios activos y trabajan en contacto directo con las mismas. (Negrín, 2002).

Llama la atención que dentro del control los que mayor número de MN tuvieron fueron aquellos que anteriormente tenían riesgo en su ocupación, muchos de los trabajadores que hoy se consideran controles ocupaban previamente puestos en la Planta de Producción. Sin embargo, es conocido que los daños que conducen a la formación de micronúcleos tienen lugar en la capa basal del tejido epitelial, donde las células se someten a la mitosis, estas células migran desde las capas basales del epitelio hasta la superficie para renovarse lo que hace que el máximo índice de formación de MN aparezca entre 1 y 3 semanas después de la exposición al agente genotóxico (Carlin *et al.*, 2010). Este argumento nos lleva a no inferir falsas relaciones de asociación o causalidad, por lo que consideramos que los resultados de asociación de incremento de MN encontrados en trabajadores con interacción actual con químicos son consecuencia de la influencia exposición-estilos de vida, en tanto los de los controles con ocupaciones previas de riesgo son imputables a actuales estilos de vidas (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013) y (Motgi *et al.*, 2014). Ha sido bien establecido que el daño genómico, tanto en células sanguíneas o exfoliativas, también se produce por la exposición

ambiental a genotoxinas implicadas en procedimientos médicos (radiación y químicos), deficiencia de micronutrientes (ácido fólico), estilos de vida (alcohol, el tabaco, drogas, estrés, etc) y factores genéticos tales como defectos hereditarios en el metabolismo del ADN y / o índices celulares de reparación (Venegas *et al.*, 2007).

Si bien como parte de las buenas prácticas de laboratorio y de producción farmacéutica y, acorde al sistema de seguridad y salud del trabajo se hace uso de medios de protección durante el proceso productivo detectamos que la exposición a derivados del carbono representó un riesgo que significativamente se asoció con el incremento de MN, sean solventes o sustancias pulverizadas, estas últimas mostraron una asociación significativa detectable por el análisis CHAID. Este resultado no es sorprendente en tanto las sustancias que en mayores volúmenes y frecuencia se usan en este colectivo laboral son de esa naturaleza, y por demás tienen referencias de efectos sobre la salud (Baker, 1994, Dominguez Odio *et al.*, 2005, Fan *et al.*, 2006, Glass *et al.*, 2015).

Hay varias citas que correlacionan positiva y significativamente el daño al material hereditario con respecto a los años de exposición. Los niveles de daño genético en individuos sometidos a períodos de exposición de entre 3 y 18 años aumentan en relación al tiempo de exposición (Peralta *et al.*, 2011). Sin embargo en nuestro estudio los años de trabajo tanto en la ocupación previa como en ocupación actual, no mostraron asociación con la incidencia de MN ni fueron diferentes entre los grupos, esto favoreció que este factor confusor no influyera en los resultados.

Hay otras variables que dificultan la interpretación de los resultados en estos estudios de estimación de riesgo por lo que cada vez se considera de mayor importancia identificar cuáles de ellas, sean técnicas o epidemiológicas, inciden en la frecuencia de MN en mucosa bucal en las poblaciones humanas (Bonassi *et al.*, 2009, Fenech, 2010).

El sexo y la edad se consideran dentro de las variables demográficas que más afectan el índice de MN, aunque los resultados son de una u otra índole (Fenech *et al.*, 2011, Khlifi *et al.*, 2013), unos hablan de incremento de la frecuencia de MN con la edad, pero sin que haya asociación positiva con el sexo (Arora *et al.*, 2014), otros observan incremento de MN con la edad en ambos sexos, o que el incremento se da solo en individuos de más de 30 años (Bonassi *et al.*, 2011). La relación positiva con el incremento de la edad se ha atribuido a alteraciones en el huso mitótico que causarían no disyunción, o defectos en la unión de las fibras al cinetocoro, o a la mayor frecuencia de roturas cromosómicas espontáneas con el envejecimiento (Diaz *et al.*, 1990, Lucero *et al.*, 2000), en cambio la no correspondencia se ha explicado en base a la diferencia en las edades promedio de los grupos a comparar, o al estrecho rango de edad, haciendo difícil hallar la correlación (Diaz *et al.*, 1990, Lucero *et al.*, 2000).

Nosotros no hallamos una asociación estadísticamente significativa de la frecuencia de células con MN con la edad, la caracterización demográfica demostró que ambos grupos fueron similares en la edad, por lo que podemos decir que es otro factor, diferente a la edad, el que incidió en la frecuencia de MN.

En relación al sexo, este se ha correlacionado indistintamente o no con la incidencia de MN (Bonassi *et al.*, 2001, Larrea, 2007), nosotros detectamos una asociación que indica una mayor incidencia de micronúcleos en el sexo femenino, incluso cuando la proporción de sexos fue similar entre los grupos con un predominio del sexo femenino. Esta asociación en nuestro trabajo se corroboró incluso al estratificar la población pues las mujeres del área química mostraron también más MN.

La influencia del sexo ha sido informada para adultos, sin embargo, su influencia no ha sido estadísticamente significativa en individuos menores de 40 años, llegando a ser más pronunciada en sujetos de mayor edad. En una revisión de un conjunto de estudios en adultos se encontró que las mujeres tenían un nivel mayor de frecuencia de MN, equivalente a un 19% más que en los hombres (Venegas *et al.*, 2007, Nefic y Handzic, 2013). Varias investigaciones concuerdan en considerar a las mujeres como más propensas a tener un mayor número de células con MN (Benítez-Leite *et al.*, 2010, Arellano *et al.*, 2013).

Más escasos y controversiales son los estudios con otros factores como lo es la dieta y estilos de vida, siendo el tabaquismo uno de los más estudiados (Nersesyan, 2006, Haveric *et al.*, 2010).

Este hábito ha sido señalado como favorecedor del incremento de MN y otras anomalías nucleares indicadoras de citotoxicidad y daño genético (Bansal *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2012). Otros estudios en cambio no muestran correlación, y aluden que el hábito no incrementa *per se* la frecuencia de MN, sin embargo cuando hay interacción con exposición ocupacional los fumadores severos tienen un incremento en el daño genético (Bonassi *et al.*, 2003).

Nosotros no hallamos asociación de este hábito con la frecuencia de MN pues la población en estudio solo contó con 2 fumadores de menos de 30 cigarros al día.

La variable consumo de alcohol nos fue imposible de cuantificar y quedó como una variable dicotómica con la desventaja de tener “sesgo de memoria”. No hallamos diferencias entre controles y expuestos en relación al consumo de alcohol ni encontramos asociación con la frecuencia de MN, lo cual coincide con otros estudios realizados utilizando la misma técnica (Bortoli *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2009, Rodrigues *et al.*, 2012). Algunos trabajos incluso encuentran una relación inversa, atribuyendo a que el alcohol disminuye la frecuencia de células apoptóticas (Nefic y Handzic, 2013). En este punto puntualizamos que para estudiar la influencia de cualquier estilo de vida es necesaria una muestra que satisfaga los requerimientos estadísticos para medir el impacto de las variables sobre la frecuencia de MN. Estimamos

nuestro tamaño muestral atenta en dar como concluyente las asociaciones para algunas variables, sobre todo aquellas que se estratifican.

Los grupos fueron homogéneos en relación al color de la piel, antecedentes familiares de cáncer, uso de medicamentos, exposición a radiación y plaguicidas. Estas variables no se asociaron con la frecuencia de células con MN aunque muchas veces estas han sido reconocidas como influyentes en este evento genético (Nefic y Handzic, 2013).

Hallamos otras asociaciones en cuanto a frecuencia de MN y hábitos de vida relacionadas con la dieta.

Suficientes estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que la dieta es un factor fundamental en la modulación de la prevención del daño al ADN. La inestabilidad genómica es un evento temprano fundamental en la carcinogénesis y para el mantenimiento de la estabilidad del genoma se requiere un gran número de micronutrientes. Las deficiencia de folato y vitamina B12, y los altos niveles de homocisteína en plasma se han asociado con daño genético (frecuencia de MN) lo que apoya la hipótesis de que el daño del genoma resulta en gran medida de un desequilibrio dietético de micronutrientes y resalta la importancia de la dieta sobre el riesgo de cáncer (Benassi *et al.*, 2007, Benassi-Evans *et al.*, 2009).

Es limitado el número de estudios que comparan los regímenes dietéticos y el daño al ADN, aunque algunos concluyen que no hay diferencias significativas en la frecuencia de MN entre vegetarianos y no vegetarianos. Los vegetarianos tienen más concentraciones plasmáticas de folato y Vit C pero menos Vit B12, y esta última se asocia con disminución de la frecuencia de MN siendo más altos sus niveles en los no vegetarianos (Kazimirova *et al.*, 2006, Benassi-Evans *et al.*, 2009, Kazimirova *et al.*, 2004).

En nuestro estudio el alto consumo de pescado y frutas tuvo una relación positiva significativa en la incidencia de MN y lo contrario sucedió con la carne roja, mayor consumo de carne se tradujo en menor incidencia de MN. Los individuos con una dieta proteica más baja en carne roja tuvieron mayor consumo frutas y vegetales con lo cual una asociación está muy relacionada con la otra. Otros autores han publicado que la frecuencia de MN decrece con un mayor consumo de frutas y pescado, lo cual imputan a las sustancias antioxidantes de las frutas (Pastor *et al.*, 2003, Åsgård *et al.*, 2007, Bonassi *et al.*, 2011). Cabría esperarse que la ingestión regular de frutas (al menos 5 días a la semana), de vegetales frescos o alimentos ricos en folato proporcionaría un efecto “protectivo” a la inducción de MN ya que el folato se requiere para síntesis y reparación del ADN actuando como un donador de metilos en la síntesis de timidilato (Jones *et al.*, 2011). Este y otros mecanismos se han usado como argumento para plantear que las frutas y vegetales pueden disminuir el riesgo de padecer cáncer (Steinmaus *et al.*, 2000, Cancer, 2005). En nuestro el consumo de frutas no atenuo el

daño genético lo cual pudiera ser consecuencia de que alimentos estén sujetos a tratamientos con xenobióticos (madurador) potencialmente genotóxicos como consecuencia de prácticas incorrectas agrocomerciales en Cuba.

Lo que refiere la literatura en cuanto a la asociación del consumo de pescado y la inducción de MN alude más bien a peces como acumuladores de contaminantes genotóxicos (arsénico, mercurio) (Pastor *et al.*, 2003; Bonassi *et al.*, 2011).

Nuestros resultados meritan ser reanalizados considerando un mayor número de controles y de variables en la encuesta y análisis.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La población en estudio fue similar en los diferentes grupos en relación a la edad, color de la piel, consumo de alcohol y tabaco, con un predominio de mujeres de la raza blanca, no fumadoras, ni consumidoras de alcohol, con antecedentes personales y familiares similares.
2. El ensayo de MN en células exfoliativas de mucosa bucal sirvió como biomarcador de efecto para detectar la acción mezclas de agentes genotóxicos
3. La exposición ocupacional relacionada con actividades de síntesis, manufactura y análisis de compuestos bioactivos en el CBQ podría estar relacionada con una mayor incidencia de daño citogenético en trabajadores de la Planta de Producción.
4. La frecuencia de MN se correlacionó positivamente con regímenes alimenticios asociados al consumo de pescado y frutas y negativamente con el consumo de carnes.

7. RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

1. Usar como biomarcador citogenético el ensayo de MN en tejido sanguíneo.
2. Utilizar otros biomarcadores de exposición y de sensibilidad para contribuir a la caracterización del riesgo ocupacional de esta población.
3. Ampliar la muestra para los estudios de asociación con estilos de vida.
4. Establecerse programas de seguimiento de salud por monitoreo en esta población.
5. Monitorear ambientalmente las instalaciones para determinar los niveles de contaminantes
6. Trazar un plan de medidas que perfeccionen el sistema de protección y seguridad en el puesto de trabajo y el entorno laboral.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Furfural. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* (1995). 63: 409-429.
- (WMA), A. M. M. (1964) Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Helsinki, Finlandia Asamblea Médica Mundial.
- Abraham, K., Gurtler, R., Berg, K., Heinemeyer, G., Lampen, A. y Appel, K. E. (2011) Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Mol Nutr Food Res*. 55: 667-678.
- Acofarma (2010) POLIETILENGLICOL 6000. In: *Ficha de Datos de Seguridad*. Madrid. España: Instituto Nacional de Toxicología., pp. 1-3.
- Albertini, R. J. (2001a) Validated biomarker responses influence medical surveillance of individuals exposed to genotoxic agents. *Radiat Prot Dosimetry*. 97: 47-54.
- Albertini, R. J. (2001b) Developing sustainable studies on environmental health. *Mutat Res*. 480-481: 317-331.
- Albertini, R. J. (2004) Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen. *IARC Sci Publ*. 153-177.
- Arellano, M. a., Camarena, L., Von-Glascoe, C., Ruiz, B., Zúñiga, E. y Montaña, T. (2013) Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California. *Género, Ambiente y Contaminación por sustancias químicas*.
- Arencibia, D., Rosario, L., Morffi, J. y Curveco, D. (2003) Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Revista de Toxicología en línea (retel)*. <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>
- Arora, P., Devi, P. y Wazir, S. S. (2014) Evaluation of genotoxicity in patients subjected to panoramic radiography by micronucleus assay on epithelial cells of the oral mucosa. *J Dent (Tehran)*. 11: 47-55.
- Ascarrunz, M., Tirado, N., González, A., Cuti, M., Cervantes, R., Huici, O. y Jors, E. (2005) Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. *Cuadernos del hospital de clínicas*. 50: 27-36.
- Åsgård, R., Rytter, E., Basu, S., Abramsson-Zetterberg, L., Möller, L. y Vessby, B. (2007) High intake of fruit and vegetables is related to low oxidative stress and inflammation in a group of patients with type 2 diabetes. *Scandinavian Journal of Food & Nutrition*. 51: 149.
- ATSDR (1997) *Reseña Toxicológica del Disulfuro de Carbono*. [En línea] Disponible desde: <http://www.atsdr.gov/es/>. [Consultado: 26 mayo 2015].
- Baker, E. L. (1994) A review of recent research on health effects of human occupational exposure to organic solvents: a critical review. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 36: 1079-1092.
- Bansal, H., Sandhu, V. S., Bhandari, R. y Sharma, D. (2012) Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population. *Contemp Clin Dent*. 3: 184-187.
- Basu, A., Ghosh, P., Das, J. K., Banerjee, A., Ray, K. y Giri, A. K. (2004) Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13: 820-827.
- Benassi-Evans, B., Clifton, P. M., Noakes, M., Keogh, J. B. y Fenech, M. (2009) High protein-high red meat versus high carbohydrate weight loss diets do not differ in effect on genome stability and cell death in lymphocytes of overweight men. *Mutagenesis*. 24: 271-277.
- Benassi, B., LeLeu, R., Bird, T., Clifton, P. y Fenech, M. (2007) Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assays for the Determination of Genotoxicity and Cytotoxicity of Cecal Water in Rats and Fecal Water in Humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 16: 2676-2680.
- Benedetti, D., Nunes, E., Sarmiento, M., Porto, C., Dos Santos, C. E., Dias, J. F. y da Silva, J. (2013) Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat Res*. 752: 28-33.

- Benítez-Leite, S., Macchi, M., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E., Mojoli, A., Cuevas, F., Alfonso, J. y Sales, L. (2010) Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr (Asunción)*. Vol. 37: 97-99.
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P. y Fenech, M. (2013) The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 753: 100-113.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. y Zijno, A. (2001) HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 37: 31-45.
- Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y. P., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E. y Fenech, M. (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res*. 543: 155-166.
- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., Bolognesi, C., Holland, N., Thomas, P. y Fenech, M. (2009) State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis*. 24: 295-302.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V. M., Demircigil, G. C., Dominguez Odio, A., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gomez-Meda, B., Gomez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M. G., Montero Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Favero Salvadori, D. M., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarin, O., Yadav, A. S., Zuniga Gonzalez, G. y Fenech, M. (2011) The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res*. 728: 88-97.
- Borgert, C. J., Wise, K. y Becker, R. A. (2015) Modernizing problem formulation for risk assessment necessitates articulation of mode of action. *Regul Toxicol Pharmacol*. Apr 27;72(3):538-551
- Bortoli, G. M., Azevedo, M. B. y Silva, L. B. (2009) Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res*. 675: 1-4.
- Brusick, D. (1987) Genetic risk estimation. *Principles of Genetic Toxicology*. pp. 121-153: Springer.
- Brusick, D. (1994) *Methods for genetic risk assessment*: CRC Press.
- Burkart, W. y Jung, T. (1998) Health risks from combined exposures: mechanistic considerations on deviations from additivity. *Mutat Res*. 411: 119-128.
- Calabrese, E. J., Shamoun, D. Y. y Hanekamp, J. C. (2015) Cancer risk assessment: Optimizing human health through linear dose-response models. *Food Chem Toxicol*. 81: 137-140.
- Canales-Aguirre, A., Padilla-Camberos, E., Gomez-Pinedo, U., Salado-Ponce, H., Feria-Velasco, A. y De Celis, R. (2011) Genotoxic effect of chronic exposure to DDT on lymphocytes, oral mucosa and breast cells of female rats. *Int J Environ Res Public Health*. 8: 540-553.
- Cancer, I. A. f. R. o. (2005) *IARC handbooks of cancer prevention*: IARC.
- Carlin, V., Artioli, A. J., Matsumoto, M. A., Filho, H. N., Borgo, E., Oshima, C. T. y Ribeiro, D. A. (2010) Biomonitoring of DNA damage and cytotoxicity in individuals exposed to cone beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol*. 39: 295-299.
- Cassiani, I. (2011) Biomonitoreo de células bucales a partir de micronúcleos en soldadores de metales en Cartagena (Bolívar). In: *Facultad de Medicina. Departamento de toxicología*. Universidad Nacional de Colombia, pp. 58.

- Castro, R., Ramirez, V. y Cuenca, P. (2004) Micronuclei and other nuclear abnormalities in the oral epithelium of female workers exposed to pesticides. *Rev Biol Trop*. 52: 611-621.
- Celik, A., Cavas, T. y Ergene-Gozukara, S. (2003) Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*. 18: 417-421.
- Ceppi, M., Gallo, F. y Bonassi, S. (2011) Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. *Mutagenesis*. 26: 247-252.
- Cima, F. (2011) Tin: Environmental Pollution and Health Effects En: Nriagu, J. (ed.). *Encyclopedia of Environmental Health* pp. 351-359. Burlington: Elsevier.
- CiOMS (1993) Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos. In: *Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas*. Ginebra, pp. 53-56.
- Díaz, S., Fonseca, G. y Fernández, I. (1990) Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. *Hereditas*. 113: 77-80.
- Dominguez Odio, A., Rojas Vazquez, E. I., Romero García, L. I., Rodríguez Tito, J. C. y Pérez Andrés, I. (2005) [Buccoepithelial cytologic lesions in workers exposed to chemical products]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 43: 221-227.
- Fan, W., Wang, W. L., Ding, S., Zhou, Y. L. y Jin, F. S. (2006) Application of micronucleus test of buccal mucosal cells in assessing the genetic damage of workers exposed to acrylonitrile. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 24: 106-108.
- Fenech, M. (2010) The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys*. 98: 234-243.
- Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W. P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M. y Bonassi, S. (2011) The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis*. 26: 239-245.
- Feretti, D., Ceretti, E., De Donno, A., Moretti, M., Carducci, A., Bonetta, S., Marrese, M. R., Bonetti, A., Covolo, L., Bagordo, F., Villarini, M., Verani, M., Schiliro, T., Limina, R. M., Grassi, T., Monarca, S., Casini, B., Carraro, E., Zani, C., Mazzoleni, G., Levaggi, R. y Gelatti, U. (2014) Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study. *BMJ Open*. 4: e006096.
- Figuro, E., Carretero, M., Cerero, R., Esparza, G. y Moreno, L. (2004) Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 9.
- Furness, D. L., Dekker, G. A., Hague, W. M., Khong, T. Y. y Fenech, M. F. (2010) Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. *Mutagenesis*. 25: 489-498.
- Gaitán Placeres, T. (2006) Desarrollo de la tecnología de producción del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, (G-1). In: *Ingeniería Química*. Santa Clara: Universidad Central de las Villas pp. 126.
- Gentile, J. M. (1988) Genetic toxicology: A textbook revisited "principles of genetic toxicology, by D. Brusick, New York: Plenum Press, 1987,. Wiley Online Library, pp. 284
- Gil, F. y Hernández, A. F. (2015) Toxicological importance of human biomonitoring of metallic and metalloid elements in different biological samples. *Food Chem Toxicol*. 80: 287-297.
- Glass, D. C., Heyworth, J., Thomson, A. K., Peters, S., Saunders, C. y Fritschi, L. (2015) Occupational exposure to solvents and risk of breast cancer. *Am J Ind Med*.
- Gómez-Arroyo, S. y Souza, V. (1985) In vitro and occupational induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes with furfuryl alcohol and furfural. *Mutat Res*. 156: 233-238.
- González, G. y Gómez-Meda, B. (2006) La prueba de micronúcleos. *La Ciencia y el Hombre. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de La Universidad Veracruzana*. Vol XIX.
- Groh, K. J., Carvalho, R. N., Chipman, J. K., Denslow, N. D., Halder, M., Murphy, C. A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K. y Watanabe, K. H. (2015) Development and application of the adverse outcome pathway

- framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. *Chemosphere*. 120: 764-777.
- GTM (2014) Polietilenglicol. In: *Hoja de datos de Seguridad*. Grupo Transmerquim (GTM), pp. 1-5.
- GUINAMA, S. L. U. (2010) POLIETILENGLICOL 6000. In: *Ficha de datos de seguridad*. Valencia: GUINAMA, S.L.U. , pp. 1-5.
- Haveric, A., Haveric, S. y Ibrulj, S. (2010) Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicol Mech Methods*. 20: 260-266.
- Health, J. (2002) *Piridina*. [En línea] Disponible desde: <http://www.state.nj.us/health/eoh/odisweb>. [Consultado: 5 mayo].
- Health, N. (2011) Alcohol etílico. In: *Derecho a Saber. Hoja informativa sobre sustancias peligrosas*. New Jersey: Department of health, pp. 1_6.
- Hintzsche, H. y Stopper, H. (2010) Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicology Letters*. 193: 124-130.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. y Fenech, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 659: 93-108.
- Huang, P., Huang, B., Weng, H., Nakayama, K. y Morimoto, K. (2009) Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Prev Med*. 48: 383-388.
- IARC (2000) *Nitromethane. In Some Industrial Chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. [En línea] Disponible desde: <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc13>. [Consultado].
- Jones, K. H., York, T. P., Juusola, J., Ferreira-Gonzalez, A., Maes, H. H. y Jackson-Cook, C. (2011) Genetic and environmental influences on spontaneous micronuclei frequencies in children and adults: a twin study. *Mutagenesis*. 26: 745-752.
- Kashyap, B. y Reddy, P. S. (2012) Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Cancer Res Ther*. 8: 184-191.
- Kazimirova, A., Barancokova, M. y Krajcovicova-Kudlackova, M. (2006) The relationship between micronuclei in human lymphocytes and selected micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Mutat. Res*. 611: 64-70.
- Kazimirova, A., Barancokova M, Volkovova, K., Staruchova, M., Krajcovicova-Kudlackova, M., Wsolova, L., Collins, A. y Dusinska, M. (2004) Does a vegetarian diet influence genomic stability? *Eur. J. Nutr*. 43: 32-38.
- Khlifi, R., Trabelsi-Ksibi, F., Chakroun, A., Rebai, A. y Hamza-Chaffai, A. (2013) Cytogenetic abnormality in exfoliated cells of buccal mucosa in head and neck cancer patients in the Tunisian population: impact of different exposure sources. *Biomed Res Int*. 2013: 905252.
- Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Knasmueller, S., Holland, N., Bolognesi, C. y Fenech, M. F. (2014) Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 759: 49-58.
- Krishnatreya, M., Kataki, A. C., Sharma, J. D. y Lahkar, K. (2015) A retrospective analysis of occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for non-melanoma skin cancers. *South Asian J Cancer*. 4: 47-48.
- Labbox, L. (2014) *Anhídrido Acético Analytical Grade ACS, ISO, Ph. Eur*. [En línea] Disponible desde: <http://www.labkem.com>. [Consultado: 17/4/2015].
- Larrea, M. (2007) Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. In: *Facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas*. La Paz-Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.

- Lewtas, J. (2007) Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res.* 636: 95-133.
- Lijinsky, W. y Reuber, M. D. (1981) Comparative carcinogenesis by some aliphatic nitrosamines in Fischer rats. *Cancer Lett.* 14: 297-302.
- Lockwood, A., Welker-Hood, K., Rauch, M. y Gottlieb, B. (2009) *El Impacto del Carbón sobre la Salud Humana*. [En línea] Disponible desde: <http://www.psr.org/coalreport>. [Consultado: 26 mayo 2015].
- Lucero, L., Pastor, S., Suarez, S., Durban, R., Gomez, C., Parron, T., Creus, A. y Marcos, R. (2000) Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res.* 464: 255-262.
- Lynge, E., Anttila, A. y Hemminki, K. (1997) Organic solvents and cancer. *Cancer Causes Control.* 8: 406-419.
- Manno, M., Sito, F. y Licciardi, L. (2014) Ethics in biomonitoring for occupational health. *Toxicol Lett.* 231: 111-121.
- Migliore L, Cocchi L y R., S. (1996) Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis.* 11: 285-290.
- Moran-Martinez, J., Monreal-de Luna, K. D., Betancourt-Martinez, N. D., Carranza-Rosales, P., Contreras-Martinez, J. G., Lopez-Meza, M. C. y Rodriguez-Villarreal, O. (2013) Genotoxicity in oral epithelial cells in children caused by nickel in metal crowns. *Genet Mol Res.* 12: 3178-3185.
- Motgi, A. A., Chavan, M. S., Diwan, N. N., Chowdhery, A., Channe, P. P. y Shete, M. V. (2014) Assessment of cytogenic damage in the form of micronuclei in oral epithelial cells in patients using smokeless and smoked form of tobacco and non-tobacco users and its relevance for oral cancer. *J Cancer Res Ther.* 10: 165-170.
- Mullins, M. E. y Hammett-Stabler, C. A. (1998) Intoxication with nitromethane-containing fuels: don't be "fueled" by the creatinine. *J Toxicol Clin Toxicol.* 36: 315-320.
- Nefic, H. y Handzic, I. (2013) The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat Res.* 753: 1-11.
- Negrín, L. Z. R. (2002) Intensificación del proceso de producción del 2-(2-nitrovinil)-furano. In: *Centro de Bioactivos Químicos*. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, pp. 189.
- Neri, M., Ceppi, M., Knudsen, L. E., Merlo, D. F., Barale, R., Puntoni, R. y Bonassi, S. (2005) Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environ Health Perspect.* 113: 1226-1229.
- Nersesyan, A. y Chobanyan, N. (2010) Micronuclei and other nuclear anomalies levels in exfoliated buccal cells and DNA damage in leukocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *J Buon.* 15: 337-339.
- Nersesyan, A. K. (2006) Does cigarette smoking induce micronuclei in buccal cells? *Am J Clin Nutr.* 84: 946-947; author reply 947-948.
- Nersesyan, A. K. y Ilin, A. I. (2007) The micronucleus assay in exfoliated human cells: a mini-review of papers from the CIS. *Tsitol Genet.* 41: 56-66.
- NTP (2010) Nitromethane. In: *Report on Carcinogens*. (National Toxicology Program, D. o. H. a. H. S., ed.).
- Oliveira, L. U., Lima, C. F., Salgado, M. A., Balducci, I. y Almeida, J. D. (2012) Comparative study of oral mucosa micronuclei in smokers and alcoholic smokers. *Anal Quant Cytol Histol.* 34: 9-14.
- OXEA (2011) *Isobutilamina*. [En línea] Disponible desde. [Consultado: Marzo-2015].
- Pastor, S. (2002) Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. In: *Departamento de Genética y Microbiología*. Universidad Autónoma de Barcelona, pp. 156.
- Pastor, S., Creus, A., Parron, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S. y Marcos, R. (2003) Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis.* 18: 249-258.

- Peralta, L., Mañas, F., Gentile, N., Bosch, B. z., Méndez, Á. y Aiassa, D. (2011) Evaluación del daño genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas: estudio de un caso en Córdoba, Argentina. *Revista Científica de Psicología, Ciencias Sociales, Humanidades y ciencias de la Salud*. 2: 7-26.
- Radziszewska, A., Karczmarek-Borowska, B., Gradalska-Lampart, M. y Filip, A. A. (2015) [Epidemiology, prevention and risk morbidity factors for lung cancer]. *Pol Merkur Lekarski*. 38: 113-118.
- Rodrigues, A. S., Arruda, M. S. y Garcia, P. V. (2012) Evidence of DNA damage in humans inhabiting a volcanically active environment: a useful tool for biomonitoring. *Environ Int*. 49: 51-56.
- Rodriguez, Z. (2007) Intensificación del proceso de producción del 2-(2-nitrovinil)-furano. In: *Ingenia Química*. Santa Clara Universidad Central de las Villas., pp. 103.
- Salerno, C., Carcagni, A., Sacco, S., Palin, L. A., Vanhaecht, K., Panella, M. y Guido, D. (2015) An Italian population-based case-control study on the association between farming and cancer: are pesticides a plausible risk factor? *Arch Environ Occup Health*. 0.
- Sanidad, C. (2007a) *Bromo*. [En línea] Disponible desde: <http://www.murciasalud.es>. [Consultado].
- Sanidad, C. d. (2007b) *Bromo*. [En línea] Disponible desde. [Consultado: 20/4/2015].
- Sanidad, S. (2008) *Anhidrido acético*. [En línea] Disponible desde: <http://www.murciasalud.es>. [Consultado: 17/4/2015].
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test. *Mutation Res*. 31: 9-15.
- Seffrin, J. R., Hill, D., Burkart, W., Magrath, I., Badwe, R. A., Ngoma, T., Mohar, A. y Grey, N. (2009) It is time to include cancer and other noncommunicable diseases in the millennium development goals. *CA Cancer J Clin*. 59: 282-284.
- Singaravelu, S. R. y Sellappa, S. (2015) Increased cytogenetic abnormalities in exfoliated oral mucosal cells of South Indian foundry workers. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22: 2721-2725.
- Steinmaus, C., Nuñez, S. y Smith, A. (2000) Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *Am J Epidemiol*. 151: 693-702.
- Stich, H. F. y Rosin, M. P. (1983) Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer*. 31: 305-308.
- Suhas, S., Ganapathy, K. S., Gayatri Devi, M. y Ramesh, C. (2004) Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res*. 561: 15-21.
- Surrallés, J., Autio, K., Nylund, L., Jarventaus, H., Norppa, H., Veidebaum, T., Sorsa, M. y Peltonen, K. (1997) Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis*. 18: 817-823.
- Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T. y Fenech, M. (2008) The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res*. 638: 37-47.
- Thomas, P. y Fenech, M. (2011) Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 682: 235-248.
- Titenko-Holland, N., Jacob, R. A., Shang, N., Balaraman, A. y Smith, M. T. (1998) Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat Res*. 417: 101-114.
- Tolbert, P. E., Shy, C. M. y Allen, J. W. (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 271: 69-77.
- Torres-Bugarin, O., Zavala-Cerna, M. G., Nava, A., Flores-Garcia, A. y Ramos-Ibarra, M. L. (2014) Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers*. 956835.
- Torres-Bugarín, O. y Ramos-Ibarra, M. (2013) Micronúcleos y anomalías nucleares en mucosa bucal para evaluar genotoxicidad y citototoxicidad. *Int. J. Morphol*. 31: 650-656.

- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Macriz-Romero Aurelio, N., Flores-García y Ramos-Ibarra, M. L. (2013) Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente*. Vol 8: 4-11.
- van Leeuwen, F. y Sangster, B. (1987) The toxicology of bromide ion. *Crit Rev Toxicol*. 18: 189-213.
- Venegas, L. A. Z., Urrizola, C. G. M. y Palacios, M. S. D. (2007) Estudio citogenético Y reproductivo en mujeres temporeras expuestas a pesticidas de la VIII región de Chile. *Theoria*. 16: 77-87.
- Welton, M., Robb, S. W., Shen, Y., Guillebeau, P. y Vena, J. (2015) Prostate cancer incidence and agriculture practices in Georgia, 2000-2010. *Int J Occup Environ Health*. 2049396714Y0000000106.
- Wultsch, G., Nersesyan, A., Kundi, M., Jakse, R., Beham, A., Wagner, K. H. y Knasmueller, S. (2014) The sensitivity of biomarkers for genotoxicity and acute cytotoxicity in nasal and buccal cells of welders. *Int J Hyg Environ Health*. 217: 492-498.
- Yildirim, I. H., Yesilada, E. y Yologlu, S. (2006) Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Genetika*. 42: 705-710.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

ANEXO 1

Este cuestionario se realiza para facilitar la investigación de detección riesgos genotóxicos en población expuesta laboralmente en el CBQ.

Este cuestionario está clasificado como confidencial y los datos y muestras obtenidas serán utilizadas exclusivamente para este estudio.

HOJA DE CONSENTIMIENTO DEL DONANTE

1. DATOS PERSONALES

Nombre..... Sexo

Fecha de nacimiento Edad Color de piel

Lugar de nacimiento Cl.

Dirección

Población Código postal

Teléfono

2. DATOS DE LA MUESTRA

Muestra recogida por

Fecha Hora

Sangre heparinizadamL (aprox.)

Células de mucosa bucal

Categoría del donante: Código del donante

Firma del donante

Firma del investigador

1. EXPOSICIÓN LABORAL

1.1. OCUPACIÓN ACTUAL

1.1.1. Describa la ocupación actual y tipo de empresa

1.1.2. Su trabajo conlleva riesgos, indicar cuáles

1.1.3. Esta expuesto/a a alguno de los siguientes agentes?:

Sin exposición	0	0
Ruido	0	1
Disolventes u otros productos químicos	0	2
Metales	0	3
Pinturas	0	4
Tintes	0	5
Asbesto	0	6
Radiaciones (Rayos X, etc.)	0	7
Polvo (.....)	0	8
Pesticidas	0	9
Derivados del carbón	1	0
Derivados del petróleo	1	1
Otros (.....)	1	2
NS/NC	9	9

--	--

1.1.4. Cuantos años lleva desempeñando la ocupación actual

--	--

1.2. OCUPACIÓN PREVIA

1.2.1. Describa su/s trabajo/s previo/s y tipo/s de empresa

Fecha

1.2.2. Alguno de los anteriores suponía exposición a:

Sin exposición	0	0
Ruido	0	1
Disolventes u otros productos químicos	0	2
Metales	0	3
Pinturas	0	4
Tintes	0	5
Asbesto	0	6
Radiaciones (Rayos X, etc.)	0	7
Polvo (.....)	0	8
Pesticidas	0	9
Derivados del carbón	1	0
Derivados del petróleo	1	1

1. EXPOSICIÓN LABORAL			
Otros (.....)	1	2	☐
NS/NC	9	9	
1.2.3. Indicar el número de años de exposición - - - -			☐

2. RESIDENCIA			
2.1. ¿Ha vivido cerca de una industria química?			☐
Distanciakm. Tiempoaños	No	☐	
(<10 km)	Sí	☐	
	NS/NC	☐	
2.2. ¿Ha vivido cerca de un incinerador de productos químicos?			☐
Distanciakm. Tiempoaños	No	☐	
(<1 km)	Sí	☐	
	NS/NC	☐	
2.3. ¿Ha vivido cerca de líneas de alta tensión?			☐
Distanciakm. Tiempoaños	No	☐	
(<200 m)	Sí	☐	
	NS/NC	☐	
2.4. ¿Ha vivido más de 3 meses en una granja donde se utilizaran Pesticidas (< 1km)?			☐
Tiempoaños	No	☐	
	Sí	☐	
	NS/NC	☐	
Comentarios:			

3. TIEMPO LIBRE			
3.1. En su tiempo libre ¿realiza alguna de las siguientes actividades?			☐
Ninguna	0		
Jardinería u horticultura	1		
Bricolaje	2		
Carpintería	3		
Mecánica de automóviles /motos	4		
Maquetas y modelismo	5		
Otros (.....)	6		

3. TIEMPO LIBRE		
Combinaciones 7 <i>En caso de respuesta afirmativa, dar detalles de posible exposición a disolventes, pinturas, colas u otras sustancias tóxicas</i> 		
4. HÁBITOS		
4.1. TABACO (5cigarrillos = 1 puro = 1 pipa) No fumador 1 Fumador 2 Ex-fumador 3 Fumador pasivo 4 (> 1 año) Sí es fumador: ¿Cuántos años hace que fuma? años ¿Cuántos cigarrillos fuma diariamente? cig/día Marca que consume mg nicotina mg alquitrán Bajo ≤ 9 mg Medio = 10-12 mg Alto ≥ 13 mg Sí es ex-fumador (más de un año): ¿Cuántos años hace que lo dejó? años ¿Cuántos cigarrillos fumaba diariamente? cig/día ¿Durante cuántos años fumó? años Observaciones:		
4.2. CONSUMO DE ALCOHOL 4.2.1 ¿Consume algún tipo de alcohol durante las comidas o en su tiempo libre? Sí 1 No 0 Vino Vasos semanales Entre semana Fin de semana g		

3. TIEMPO LIBRE			
Cerveza Licores ¿Otras bebidas?	Cañas semanales Copas semanales Vasos semanales		
gramos totales:			
4.2.2 ¿Ha tenido alguna vez problemas de alcoholismo?	No Sí NS/NC	0 1 9	
4.3. TÉ O CAFÉ			
4.3.1 ¿Consume té o café?	Sí No	1 0	
4.3.2 Indique el número de tazas al día:	Té t/día Café t/día		

4.4. DIETAS													
4.4.2 ¿Cuántas veces a la semana suele comer los siguientes ingredientes?													
Carnes rojas Carnes blancas Pescado Vegetales frescos Vegetales cocinados Piezas de fruta que come diariamente g/día	<table border="1" style="margin: 0 auto; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> </table>												
4.5.1 Que tipo de agua consume													
Agua de pozo Agua tratada Agua clorada en casa Agua d acueducto													
4.4.3 Indica la frecuencia semanal de consumo de los siguientes tipos de grasa y aceites:													
<i>Poco</i> <i>Medio</i> <i>Mucho</i> 													

3. TIEMPO LIBRE

Aceite vegetal (girasol, semilla, ...)	1	2	3		
Grasas vegetales / margarina	1	2	3		
Grasas de animales / manteca	1	2	3		

5. HISTORIA MÉDICA

5.1. ANTECEDENTES FAMILIARES

5.1.2. ¿Existe algún miembro de su familia con problemas de fertilidad, defectos de nacimiento, alteraciones genéticas o cáncer? Indicar alteración y parentesco.

5.2. ANTECEDENTES PERSONALES

5.2.1. Tiene o ha tenido problemas en alguno de los procesos indicados:

Procesos circulatorios	1
Procesos renales	2
Procesos respiratorios	3
Procesos neurológicos	4
Procesos digestivos	5
Procesos dérmicos	6
Pr. Infecciosos (hepatitis, meningitis)	7
Cáncer	8
NS/NC	9

Especificar enfermedades y edad de -----

5.2.3. ¿Toma algún medicamento habitualmente?

No	0	0
Insulina /Tratamiento diabetes	0	1
Antibióticos	0	2
Tranquilizantes /Psicofármacos	0	3
Diuréticos	0	4
Antiácidos	0	5
Antihistamínicos	0	6
Vitaminas /Minerales	0	7
Antipiréticos /Analgésicos	0	8
Otros (.....)	1	2
NS/NC	9	9

Indicar -----

5.2.4. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre en el último año?

☐
☐

3. TIEMPO LIBRE							
	No	0	Si	1	NS/NC	9	☐
5.2.5. ¿Se ha sometido alguna vez a terapia de rayos X?							
	No	0	Si	1	NS/NC	9	☐

ANEXO 2

CROSSTABS

/TABLES=café Té carneblancavegetalesfrescosVegetalescocinados frutas transfusionrayoXenferemedades BY
GrupoG

Crosstabs

Notes

Output Created	21-MAY-2015 14:22:24	
Comments		
	Data	D:\aliuska\CBQ\Giselle\Giselle1.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
Input	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data	39
	File	
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
MissingValueHandling		Statistics for each table are based on all the cases with valid data in the specified range(s) for all variables in each table.
	Cases Used	CROSSTABS
		/TABLES=café Té carneblancavegetalesfrescosVegetales cocinados frutas transfusionrayoXenferemedades BY GrupoG
Syntax		/FORMAT=AVALUE TABLES
		/STATISTICS=CHISQ
		/CELLS=COUNT COLUMN
		/COUNT ROUND CELL.
	Processor Time	00:00:00.02
Resources	Elapsed Time	00:00:00.02
	DimensionsRequested	2
	CellsAvailable	174734

[DataSet1] D:\aliuska\CBQ\Giselle\Giselle1.sav

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Número de tazas de café * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
Número de tazas de té * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
Frecuencia de consumo de carne blanca por semana * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
Número de vegetales frescos * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
Número de vegetales cocinados * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
Número de frutas * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
transfusión * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
rayo X * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%
Padecimiento de enfermedades * Grupo Gisselle	39	100.0%	0	0.0%	39	100.0%

Número de tazas de café * Grupo Gisselle

Crosstab

			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Número de tazas de café	0	Count	8	5	13
		% within Grupo Gisselle	32.0%	35.7%	33.3%
	1	Count	2	3	5
		% within Grupo Gisselle	8.0%	21.4%	12.8%
	2	Count	6	1	7
		% within Grupo Gisselle	24.0%	7.1%	17.9%
	3	Count	4	3	7
		% within Grupo Gisselle	16.0%	21.4%	17.9%
	4	Count	3	1	4

		% within Grupo Gisselle	12.0%	7.1%	10.3%
	5	Count	1	0	1
		% within Grupo Gisselle	4.0%	0.0%	2.6%
	6	Count	1	1	2
		% within Grupo Gisselle	4.0%	7.1%	5.1%
Total		Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.807 ^a	6	.703
Likelihood Ratio	4.293	6	.637
Linear-by-Linear Association	.171	1	.679
N of Valid Cases	39		

a. 13 cells (92.9%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

Número de tazas de té * Grupo Gisselle

Crosstab

			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Número de tazas de té	0	Count	11	10	21
		% within Grupo Gisselle	44.0%	71.4%	53.8%
	1	Count	8	4	12
		% within Grupo Gisselle	32.0%	28.6%	30.8%
	2	Count	5	0	5
		% within Grupo Gisselle	20.0%	0.0%	12.8%
	3	Count	1	0	1
		% within Grupo Gisselle	4.0%	0.0%	2.6%
	Total	Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.648 ^a	3	.199
Likelihood Ratio	6.580	3	.087
Linear-by-Linear Association	4.195	1	.041
N of Valid Cases	39		

a. 5 cells (62.5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

Frecuencia de consumo de carne blanca por semana * Grupo Gisselle

Crosstab			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Frecuencia de consumo de carne blanca por semana	1	Count	3	3	6
		% within Grupo Gisselle	12.0%	21.4%	15.4%
	2	Count	8	4	12
		% within Grupo Gisselle	32.0%	28.6%	30.8%
	3	Count	10	4	14
		% within Grupo Gisselle	40.0%	28.6%	35.9%
	4	Count	3	3	6
		% within Grupo Gisselle	12.0%	21.4%	15.4%
	5	Count	1	0	1
		% within Grupo Gisselle	4.0%	0.0%	2.6%
	Total	Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.958 ^a	4	.743
Likelihood Ratio	2.257	4	.689
Linear-by-Linear Association	.169	1	.681
N of Valid Cases	39		

a. 7 cells (70.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

Número de vegetales frescos * Grupo Gisselle

Crosstab			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Número de vegetales frescos	0	Count	1	0	1
		% within Grupo Gisselle	4.0%	0.0%	2.6%
	1	Count	0	2	2
		% within Grupo Gisselle	0.0%	14.3%	5.1%
	2	Count	6	1	7
		% within Grupo Gisselle	24.0%	7.1%	17.9%
	3	Count	6	6	12
		% within Grupo Gisselle	24.0%	42.9%	30.8%
	4	Count	5	1	6
		% within Grupo Gisselle	20.0%	7.1%	15.4%
	5	Count	4	2	6
		% within Grupo Gisselle	16.0%	14.3%	15.4%
	7	Count	3	2	5
		% within Grupo Gisselle	12.0%	14.3%	12.8%
	Total	Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7.607 ^a	6	.268
Likelihood Ratio	8.768	6	.187
Linear-by-Linear Association	.013	1	.908
N of Valid Cases	39		

a. 13 cells (92.9%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

Número de vegetales cocinados * Grupo Gisselle

Crosstab

			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Número de vegetales cocinados	0	Count	2	6	8
		% within Grupo Gisselle	8.0%	42.9%	20.5%
	1	Count	4	2	6
		% within Grupo Gisselle	16.0%	14.3%	15.4%
	2	Count	10	3	13
		% within Grupo Gisselle	40.0%	21.4%	33.3%
	3	Count	4	2	6
		% within Grupo Gisselle	16.0%	14.3%	15.4%
	4	Count	5	1	6
		% within Grupo Gisselle	20.0%	7.1%	15.4%
	Total	Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7.243 ^a	4	.124
Likelihood Ratio	7.195	4	.126
Linear-by-Linear Association	4.595	1	.032
N of Valid Cases	39		

a. 8 cells (80.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.15.

Número de frutas * Grupo Gisselle

Crosstab

			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Número de frutas	0	Count	1	3	4
		% within Grupo Gisselle	4.0%	21.4%	10.3%
	1	Count	2	1	3
		% within Grupo Gisselle	8.0%	7.1%	7.7%
	2	Count	6	4	10
		% within Grupo Gisselle	24.0%	28.6%	25.6%
	3	Count	9	4	13
		% within Grupo Gisselle	36.0%	28.6%	33.3%

4	Count	5	1	6
	% within Grupo Gisselle	20.0%	7.1%	15.4%
5	Count	1	0	1
	% within Grupo Gisselle	4.0%	0.0%	2.6%
6	Count	0	1	1
	% within Grupo Gisselle	0.0%	7.1%	2.6%
7	Count	1	0	1
	% within Grupo Gisselle	4.0%	0.0%	2.6%
Total	Count	25	14	39
	% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.758 ^a	7	.454
Likelihood Ratio	7.687	7	.361
Linear-by-Linear Association	1.916	1	.166
N of Valid Cases	39		

a. 14 cells (87.5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

Transfusión * Grupo Gisselle

Crosstab

		Grupo Gisselle		Total
		Control	Expuesto	
transfusión	0	Count 24	Count 14	Count 38
		% within Grupo Gisselle 96.0%	% within Grupo Gisselle 100.0%	% within Grupo Gisselle 97.4%
	1	Count 1	Count 0	Count 1
		% within Grupo Gisselle 4.0%	% within Grupo Gisselle 0.0%	% within Grupo Gisselle 2.6%
Total		Count 25	Count 14	Count 39
		% within Grupo Gisselle 100.0%	% within Grupo Gisselle 100.0%	% within Grupo Gisselle 100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.575 ^a	1	.448	1.000	.641
ContinuityCorrection ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.904	1	.342		
Fisher'sExact Test					
Linear-by-Linear Association	.560	1	.454		
N of Valid Cases	39				

a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

b. Computed only for a 2x2 table

Rayo X * Grupo Gisselle

Crosstab

		Grupo Gisselle		Total	
		Control	Expuesto		
rayo X	0	Count	25	13	38
		% within Grupo Gisselle	100.0%	92.9%	97.4%
	1	Count	0	1	1
		% within Grupo Gisselle	0.0%	7.1%	2.6%
Total		Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.833 ^a	1	.176	.359	.359
ContinuityCorrection ^b	.089	1	.766		
Likelihood Ratio	2.096	1	.148		
Fisher'sExact Test					
Linear-by-Linear Association	1.786	1	.181		
N of Valid Cases	39				

a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

b. Computed only for a 2x2 table

Padecimiento de enfermedades * Grupo Gisselle

Crosstab

			Grupo Gisselle		Total
			Control	Expuesto	
Padecimiento de enfermedades	0	Count	6	4	10
		% within Grupo Gisselle	24.0%	28.6%	25.6%
	1	Count	19	10	29
		% within Grupo Gisselle	76.0%	71.4%	74.4%
Total		Count	25	14	39
		% within Grupo Gisselle	100.0%	100.0%	100.0%

hi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.098 ^a	1	.754	1.000	.520
ContinuityCorrection ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.097	1	.755		
Fisher'sExact Test					
Linear-by-Linear Association	.096	1	.757		
N of Valid Cases	39				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.59.

b. Computed only for a 2x2 table

ANEXO 3

