



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# **Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Especialización en Salud en el Trabajo**

Análisis de estrés oxidativo por exposición laboral a tolueno en  
una fábrica de plásticos de la Ciudad de México.

## **TESIS**

Que para obtener el grado de especialista en Salud en el Trabajo.

Presenta:

**Med. Cir. Víctor Hugo García Chávez**

**Asesores:** Dr. Horacio Tovalín Ahumada  
Dr. Rubén Marroquín Segura

**Jurados:** Mta. Martha Méndez Vargas  
M. en C. Marlene Rodríguez Martínez  
M. en C. Marco Román

**Febrero de 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Resumen.....	ii
1. Introducción .....	1
2. Planteamiento del problema .....	2
3. Antecedentes .....	3
Factores de Riesgo en la empresa.....	3
Uso industrial de tolueno.....	3
Daños potenciales a la salud.....	5
Magnitud .....	5
Estrés oxidativo.....	6
Proteínas antioxidantes .....	7
Daño oxidativo .....	8
Estrés oxidativo por tolueno.....	9
Morbilidad en la empresa .....	10
4. Objetivos e hipótesis.....	12
5. Métodos .....	14
6. Resultados.....	18
7. Discusión .....	24
Bibliografía.....	30
Anexos .....	a
A. Plan de manejo estadístico.....	a
B. Descripción de Métodos de Laboratorio .....	b
I. Determinación de colesterol .....	b
II. Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial.....	e
C. Instrumentos y consentimiento informado.....	f

## Resumen

### Introducción:

Es poco lo que se conoce acerca de la exposición a tolueno en condiciones ocupacionales reales. La mayoría de las investigaciones son de abuso de tolueno o modelos animales. Algunos de estos estudios han indicado que el estrés oxidativo podría tener un papel crucial en el mecanismo de toxicidad del tolueno. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del tolueno en los mecanismos enzimáticos antioxidantes en trabajadores ocupacionalmente a tolueno en una fábrica de plásticos de la Ciudad de México.

### Método:

Se trata de un estudio transversal-comparativo de 56 trabajadores varones, en dos grupos, 25 expuestos y 31 no expuestos a tolueno en el trabajo. Se determinó ácido hipúrico en todos los trabajadores expuestos. Se midieron ceruloplasmina, glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD), la primera en todos los participantes y las enzimas sólo en una muestra de 20. Primero los niveles de enzimas antioxidantes fueron analizados por grupo y luego los niveles de enzimas fueron correlacionados con el nivel de ácido hipúrico en el grupo expuesto.

### Resultados:

Edad, consumo de alcohol y tabaco, glucosa, y niveles de colesterol y triglicéridos fueron similares en ambos grupos. El rango de ácido hipúrico en el grupo expuesto fue de 0.34 a 0.69 g/g de creatinina. No se encontró diferencia en los niveles de enzimas antioxidantes entre los grupos. No hubo correlación entre ácido hipúrico y ceruloplasmina o SOD pero hubo correlación positiva con GPX ( $R= 0.701$ ,  $p\leq 0.05$ ). La correlación entre ácido hipúrico y GPx se mantuvo tras estratificar por factores confusores. La correlación más fuerte fue observada en el grupo más joven ( $R= 0.959$ ,  $p\leq 0.01$ ).

### Conclusiones:

A pesar que el tamaño de la muestra fue pequeño, la magnitud de la correlación entre ácido hipúrico y GPx es importante y se mantiene al estratificar. Al parecer la GPx es la primera enzima antioxidante que responde a la exposición ocupacional de tolueno.

## 1. Introducción

El tolueno es uno de los disolventes orgánicos más ampliamente utilizado en la industria, sólo o en mezclas. A pesar de que se le ha asociado a múltiples efectos tóxicos en pocos se ha podido establecer una relación causal y los mecanismos de lesión no han sido claramente explicados aún (Singh et al., 2010).

El estrés oxidativo es la resultante del desbalance a nivel celular entre los factores prooxidantes a que se encuentra sometido el organismo y los mecanismos antioxidantes con los que cuenta. Los principales factores prooxidantes son los radicales libres, tanto endógenos como exógenos.

En la actualidad se ha estimado que gran parte de los efectos tóxicos crónicos de las sustancias a las que se expone el hombre, incluido el tolueno, pueden estar relacionados al desbalance en los mecanismos prooxidantes-antioxidantes; estas inferencias han sido alcanzadas, en general, a partir de estudios in vitro, en modelos de abuso o en animales, pero poco se ha estudiado en condiciones laborales reales.

## 2. Planteamiento del problema

En esta empresa la proporción de obreros expuesta a tolueno es significativa; se conocen muchas alteraciones a la salud asociadas a exposición por disolventes, algunas con repercusión grave e irreversible entre las que se reconoce la hipoacusia; esta es la principal enfermedad de trabajo en la empresa.

En los efectos a la salud asociados con exposición a tolueno pocas veces se ha podido demostrar asociación causal. No están claros los mecanismos por los que se producen la mayoría de esos efectos y es relativamente poco lo que se sabe respecto a condiciones laborales reales. La mayoría de los estudios son modelos de abuso o en animales, estos últimos han indicado recientemente que el estrés oxidativo podría tener un papel crucial en el mecanismo de toxicidad (Singh et al., 2010; Gordon et al., 2010; Martínez et al., 2010; Karabutul et al., 2009; El-Nabi et al., 2008; Costa et al., 2006; Coskun et al., 2005).

Dado que existe poca investigación sobre estrés oxidativo y exposición a tolueno en condiciones reales de trabajo resulta relevante plantear el siguiente cuestionamiento:

¿Cuál es la asociación entre proteínas antioxidantes y exposición laboral a tolueno? En una fábrica de plásticos de la Ciudad de México.

### 3. Antecedentes

Se trata de una empresa de capital estadounidense ubicada al norte de la Ciudad de México, tiene 50 años en nuestro país y forma parte de un grupo transnacional con más de 100 años de antigüedad. El giro de la empresa es industrial, se dedica a la fabricación de plásticos. La mitad de los obreros en la empresa se exponen en sus labores diarias a tolueno.

#### **Factores de Riesgo en la empresa**

Todos los obreros están en contacto con maquinaria industrial. Todos los obreros están expuestos a niveles de ruido entre 79 y 90 dB(A). Cuatro trabajadores están expuestos a silicatos. La mitad de los obreros están expuestos a tolueno. Una cuarta parte está expuesta a condiciones ergonómicas desfavorables. (Fuente: Evaluación Ergonómica 2009 de la empresa).

Por lo anterior y otros factores esta empresa pertenece a la Clase IV de las cinco que existen en el I.M.S.S., donde V es el grupo de empresas con mayor grado de riesgo posible.

#### **Uso industrial de tolueno.**

El tolueno es un disolvente orgánico con múltiples aplicaciones industriales, como materia prima, limpiador, disolvente o presente en los combustibles; se emplea ya sea purificado o en mezcla con otros hidrocarburos aromáticos principalmente benceno y xileno.

El uso de tolueno ha disminuido a nivel mundial, pero continúa siendo el disolvente más empleado (Inoue et al., 2008). En la Unión Europea el uso del tolueno está prohibido en la producción de diversos cosméticos y lo tiene clasificado como dañino, con peligro de serio daño a la salud. (European Comission, 2003).

En México existe normatividad sobre su uso para evitar la sobreexposición laboral. Por un lado la NOM-010-STPS-1999 regula la exposición en lo referente a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se utiliza; señala como límite máximo permisible de exposición a tolueno en el ambiente laboral  $188\text{mg}/\text{mm}^3$  (50 ppm), cifra que emplean algunos países europeos, la legislación en E.U. tiene establecido este parámetro en 20 ppm (Maguin et al., 2009).

Por otro lado la NOM-047-SSA establece los límites biológicos máximos permisibles de exposición a tolueno en los trabajadores de estos centros, realizando para ello determinación de ácido hipúrico en orina o de tolueno en sangre venosa. Dado el carácter no invasivo, la auto-recolección de orina es la muestra de elección para realizar la evaluación biológica de exposición. A nivel internacional se han empleado principalmente el ácido hipúrico, o-cresol, ácido bencil mercaptúrico y tolueno no metabolizado en orina como indicadores biológicos de exposición a tolueno (Inoue et al., 2008); siendo de estos el de primera elección ácido hipúrico, correlacionando aún mejor que el tolueno no metabolizado en exposiciones superiores a 10 ppm (Ukai et al., 2007), aunque en exposiciones a muy bajas concentraciones, menores a 2 ppm, sólo el



tolueno no metabolizado, en sangre o en orina, es un marcador confiable (Inoue et al., 2008).

### **Daños potenciales a la salud.**

El tolueno ha sido asociado claramente con dermatosis, daño a la capacidad auditiva (Gopal et al., 2008) y efectos neurotóxicos, desde síntomas prenarcóticos por exposición aguda hasta encefalopatía tóxica (Suzuki et al., 2009), polineuropatía, alteraciones visuales y motrices por exposición crónica; con menor peso se ha establecido también relación con disminución de la fertilidad en varones (Nakai et al., 2003), hepatotoxicidad, alteraciones renales, pulmonares, olfatorias, cardiovasculares (Chang et al., 2009), hematológicas y enfermedad autoinmune similar a Goodpasture (Karabulut et al., 2009).

La legislación mexicana reconoce como riesgos de trabajo por exposición a tolueno la dermatosis, la conjuntivitis, la queratoconjuntivitis y la intoxicación (H. Congreso de la Unión, 1970).

### **Magnitud**

La exposición ocupacional a disolventes orgánicos es muy frecuente en todo tipo de empresas, en menor o mayor grado, dado que se usan como limpiadores y desengrasantes (European Commission, 2003). En la empresa en cuestión la exposición se da en la mitad de los obreros, con equipo de protección personal, no se tienen mediciones recientes de la concentración de

tolueno en el ambiente (Fuente: Registros de Vigilancia al Personal Ocupacionalmente Expuesto 2002-2010 de la empresa).

### **Estrés oxidativo**

El término “estrés oxidativo” ha sido empleado, sin ser claramente definido, para referirse al desbalance entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes. Sies (1991) lo definió como “una perturbación en el balance pro-oxidante – antioxidante a favor del primero, dando lugar a daño potencial” (Halliwell et al., 2004).

Los radicales libres son átomos o moléculas, inestables, altamente reactivas con un electrón no apareado en su órbita externa; por su parte las especies reactivas, de oxígeno, nitrógeno o cloro, son moléculas que a pesar de no tener electrón no apareado en su órbita externa participan en las reacciones REDOX en sentido pro-oxidante (Cavalcante et al., 2009).

Los antioxidantes son, según Halliwell y Gutteridge (1999) “cualquier sustancia que, cuando se presenta en baja concentración en comparación a la del sustrato oxidable, significativamente previene o disminuye la oxidación de ese sustrato” (Halliwell et al., 2004).

Los mecanismos antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. De los primeros los principales son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx). Los principales antioxidantes no enzimáticos

son el glutati3n, la ubiquinona, el 1cido 1rico y las prote3nas transportadoras de metales de transici3n, transferrina y ceruloplasmina (Cavalcante et al., 2009).

### **Prote3nas antioxidantes**

Las super3xido dismutasas (SODs) son una familia de enzimas catal3ticas. Estas enzimas detoxifican los productos del estr3s oxidativo catalizando la dismutaci3n del radical super3xido a per3xido de hidr3geno y ox3geno molecular. La CuZn-SOD (SOD1), citoplasm1tica, es la responsable del 90% de la actividad de las SODs (Busuttil et al., 2005).

La glutati3n peroxidasa (GPx), otra enzima antioxidante, tiene por funci3n catalizar la oxidaci3n del glutati3n reducido por los per3xidos. El glutati3n es un tiol, antioxidante intracelular, reacciona con estresores oxidantes y los neutraliza, as3 la GPx lo restablece a su estado antioxidante (Paradise et al., 2010).

La ceruloplasmina es una prote3na transportadora de cobre, su principal funci3n enzim1tica es reducir ox3geno molecular y oxidar iones ferrosos en formas f3rricas menos t3xicas sin la liberaci3n de ROS; los iones ferrosos de otro modo entran a las reacciones Fenton y desencadenan una cascada de estr3s oxidativo (Altamura et al., 2009). La ceruloplasmina es de este modo un antioxidante no enzim1tico por ser transportador de metales de transici3n, adem1s de ser considerada prote3na de fase aguda y tener en realidad actividad enzim1tica.

### **Daño oxidativo**

Cuando las defensas antioxidantes son rebasadas por los factores pro-oxidantes se produce lesión o muerte celular. Los principales mecanismos por los que se produce el daño es alteración de macromoléculas.

Los lípidos son oxidados, principalmente peroxidados, clorados o nitrados dando lugar a lesión de las membranas celulares. Como marcadores biológicos de peroxidación lipídica se han empleado la prueba con ácido tiobarbitúrico (TBA) y la determinación de isoprostanos (Halliwell et al., 2004).

El daño al DNA consiste en la alteración de bases y azúcares principalmente por el radical hidroxilo. La medición de los productos de daño al DNA no es sencilla por la inestabilidad de varios de ellos, lo más empleado es la cuantificación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en orina (Halliwell et al., 2004).

Las proteínas pueden ser dañadas por el estrés oxidativo durante su modificación pos-traducciona l o posterior a esto con inactivación enzimática, degeneración estructural o activación del sistema proteolítico (Cavalcante et al., 2009). La oxidación de proteínas puede producir radicales aminoácidos cuya medición no es confiable como marcador de daño a proteínas; lo más empleado es la determinación, en fluidos o tejidos, de grupos carbonilos que se liberan de proteínas dañadas (Halliwell et al., 2004).

Otro indicador menos específico que ha sido evaluado en estrés oxidativo es la proteína C reactiva (PCR). La PCR es una proteína de fase aguda producida por el hígado y adipocitos, difícil de detectar en concentraciones muy bajas y

en personas sanas, aumenta su concentración en función de la inflamación o daño tisular (Meier-Ewert et al., 2001). La principal función de la PCR es como opsonina para favorecer la fagocitosis de bacterias y células dañadas por lo que su concentración aumenta en respuesta a las citocinas que neutrófilos y macrófagos liberan en contacto con estas (Pepys et al., 2003).

### **Estrés oxidativo por tolueno**

Se ha demostrado la relación entre tolueno y estrés oxidativo en modelos in vitro (Singh et al, 2010; Karabulut et al., 2009), de animales (El-Nabi et al., 2008) y de abuso (Martínez et al., 2010), adicionalmente se sabe que organismos más viejos son más afectados (Gordon et al., 2010). Poco se ha investigado en humanos (Coskun et al., 2007) y dadas sus características industriales pocas veces se estudia como exposición única y no como mezcla de disolventes.

Algunos estudios con exposición única a tolueno concuerdan en que este factor eleva el estrés oxidativo, particularmente nitritos, TBARS y GSSG; no así en su efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Se ha encontrado en modelos animales aumento de la actividad de SOD y caspasa así como marcada disminución de GPx en todos los tejidos (El-Nabi et al., 2008), mientras en modelos in vivo e in vitro con eritrocitos humanos se ha encontrado reducción significativa de todas las enzimas antioxidantes (Karabulut et al., 2009).

Los indicadores de estrés oxidativo y mecanismos antioxidantes son prácticamente los mismos en las investigaciones realizadas con distintos modelos y en distintas latitudes (Singh et al., 2010; Gordon et al., 2010; Martínez et al., 2010; Karabulut et al., 2009; El-Nabi et al., 2008; Coskun et al., 2005), en el presente estudio se propone incluir la ceruloplasmina, proteína de fase aguda (Serin et al., 2010) ya estudiada como marcador de estrés oxidativo (Skesters et al., 2010; Yapur et al., 2007; Srivatsan et al., 2009; Tapryal et al., 2009), cuya aplicación en estudios similares a este no se encuentra reportada en la literatura.

No se conoce del todo el mecanismo por el cual el tolueno genera estrés oxidativo, se sabe que produce disfunción de canales de iones (Maguin et al., 2009), desacopla la cadena de transportes de electrones (Myhre, et al. 2000) y probablemente cataliza de forma directa la formación de especies reactivas de oxígeno, adicionalmente el alcohol bencílico y el ácido benzoico, metabolitos del tolueno, tienen actividad intrínseca de radical libre (Mattia et al., 1991).

### **Morbilidad en la empresa.**

Respecto a los daños a la salud que pueden estar asociados al estrés oxidativo por exposición a tolueno, en esta empresa, se sospecha que existe un caso aunque ha sido manejado como probable epilepsia por el I.M.S.S. Además, se puede mencionar que la prevalencia de daño auditivo en 2009 fue de 30 por cada 100 trabajadores, ninguna calificada por el I.M.S.S., cifra elevada que hace necesario pensar en si existe una sinergia presente entre la exposición a

ruido y tolueno en esta población. (Fuente: Estadísticas 2002-2010, Servicio Médico de la empresa).

#### 4. Objetivos e hipótesis

Objetivo general:

Analizar los efectos sobre niveles de mecanismos enzimáticos antioxidantes en los trabajadores expuestos ocupacionalmente a tolueno en una fábrica de la Ciudad de México.

Hipótesis general:

La exposición laboral a tolueno incrementa los niveles de estrés oxidativo y el organismo responde incrementando en lo posible sus recursos enzimáticos antioxidantes.

Objetivos e hipótesis específicos:

OBJETIVOS	HIPÓTESIS
Determinar los niveles plasmáticos de ceruloplasmina, SOD y GPx en trabajadores expuestos y no expuestos a tolueno.	Los expuestos a tolueno responden aumentando sus mecanismos antioxidantes. Las cifras de enzimas antioxidantes son menores en los no expuestos que en los expuestos.
Determinar los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol y triglicéridos en todos los trabajadores.	Las alteraciones metabólicas modifican el estrés oxidativo por exposición a tolueno.
Evaluar ingesta de alcohol y tabaco con un cuestionario de auto llenado.	La exposición a tabaco y alcohol modifican el estrés oxidativo por exposición a tolueno.



---

<p>Determinar la exposición extra laboral a disolventes, presencia de enfermedades crónicas, consumo de fármacos y drogas.</p>	<p>La exposición a tóxicos y la presencia de enfermedades crónicas modifican el estrés oxidativo por exposición a tolueno.</p>
<p>Obtener de fuente secundaria los niveles de ácido hipúrico de los trabajadores expuestos.</p>	<p>El indicador biológico de exposición se correlaciona mejor con la sobre exposición real que el monitoreo ambiental.</p>
<p>Correlacionar los niveles de enzimas antioxidantes con los niveles de ácido hipúrico.</p>	<p>Existe relación directa entre los niveles de enzimas antioxidantes y el nivel de ác. Hipúrico.</p>

---

## 5. Métodos

5.1 Tipo de estudio: transversal comparativo de correlación.

5.2 Población: obreros (68 en total, todos son varones) de una fábrica de plásticos de la Ciudad de México.

5.3 Método de selección: toda la población, dividida en dos grupos según presencia o ausencia de exposición a tolueno.

- Criterios de inclusión al grupo de expuestos: trabajadores de producción de la fábrica, cualquier antigüedad, cualquier edad que trabajen en la nave donde se realizan procesos con tolueno.
- Criterios de exclusión: trabajadores que no deseen participar.
- Criterios de eliminación: trabajadores que consuman drogas (excluido alcohol y tabaco) o medicamentos, trabajadores con enfermedades crónicas.

La determinación de SOD y GPx se realizará en una sub-muestra de 20 sujetos electos de manera aleatoria estratificada según presencia o ausencia de exposición a tolueno.

5.4 Variables:

<b>Tipo</b>	<b>Variables</b>	<b>Operacionalización</b>
<b>Independiente</b>	Exposición laboral a tolueno	Concentración de ácido hipúrico en orina recolectada al final de la jornada el último día de la semana.

<b>Dependiente</b>	Respuesta antioxidante	Niveles plasmáticos de ceruloplasmina, SOD y GPx en muestra tomada al final de la jornada el último día de la semana.
<b>De Confusión</b>	Edad	Años cumplidos
	Consumo de alcohol	Sin consumo, consumo sin riesgo, consumo riesgoso, consumo problema
	Consumo de tabaco	Sin riesgo, bajo riesgo, riesgo moderado, alto riesgo, dañino.
	Consumo de otras drogas	Consumidor, no consumidor
	Consumo de medicamentos	Consumidor, no consumidor
	Presencia de enfermedad crónica	Sin enfermedad crónica, Diabético, Hipertenso, Enfermedad autoinmune, Otra enfermedad crónica
	Glucemia	mg/dl en glucemia capilar
	Colesterolemia	mg/dl en colesterolemia venosa
	Trigliceridemia	mg/dl en trigliceridemia venosa

### 5.5 Instrumentos:

- Exposición a tolueno: Registro de Vigilancia Epidemiológica en Trabajadores Expuestos a Tolueno de la empresa.
- Indicadores de respuesta antioxidante: Determinación analítica de niveles plasmáticos de ceruloplasmina, SOD y GPx.
- Consumo de alcohol: AUDIT (Alcohol Use Disorder Identification Test) (OMS) validado para población mexicana.
- Consumo de tabaco: Cuestionario de autoaplicación.
- Consumo de drogas, Consumo de medicamentos, Presencia de enfermedad crónica: Expediente Clínico.
- Alteración metabólica: determinar glucemia capilar (Accutrend Plus, Roche). Determinación analítica de colesterol y triglicéridos.

### 5.6 Procedimientos:

- a) Aplicar los cuestionarios AUDIT y cuestionario de autoaplicación para evaluación de exposición a tabaco a todos los obreros que deseen participar.
- b) Obtener los datos sobre consumo de drogas, consumo de medicamentos y presencia de enfermedad crónica de Examen Periódico anual en el Expediente Clínico.
- c) Obtener una muestra de sangre el último día de la semana laboral, programada para el mismo día que la empresa realiza la determinación de ácido hipúrico según su Programa de Vigilancia Epidemiológica. La muestra de 10 ml servirá para la determinación de:

1. Niveles plasmáticos de ceruloplasmina, método de inmunodifusión radial (Ehrenwald et al., 1993);
  2. SOD y GPx, mediante paquetes de reactivos marca RANDOX; y
  3. Triglicéridos, colesterol total.
- d) Determinación de glucosa en sangre capilar.
- e) Recabar los resultados de la determinación de ácido hipúrico que la empresa realice.
- f) Análisis de la información.

5.7 El análisis de los datos se realizó usando el Paquete Informático SPSS 15.0 con los cruces estadísticos detallados en el Anexo A. Las medianas para las variables estudiadas se resumirán en una tabla para expuestos y no expuestos; otra tabla resumirá las ecuaciones de regresión obtenidas para los análisis multivariados y se establecerá su matriz de correlaciones.

5.8 Aspectos éticos. Se solicitó Consentimiento Informado de cada participante. El investigador declara no tener conflicto de interés.

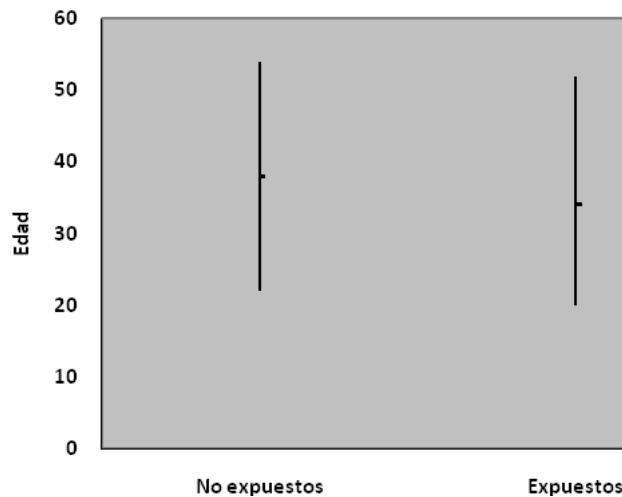
## 6. Resultados

### 6.1. Características de los trabajadores estudiados

El universo constaba de 68 trabajadores varones; 12 no desearon participar. Los 56 participantes se distribuyeron de la siguiente manera: 26 (46.42%) no expuestos y 30 (53.58%) expuestos. Ninguno presentó consumo de drogas o medicamentos, ni enfermedades crónicas; ninguno fue excluido.

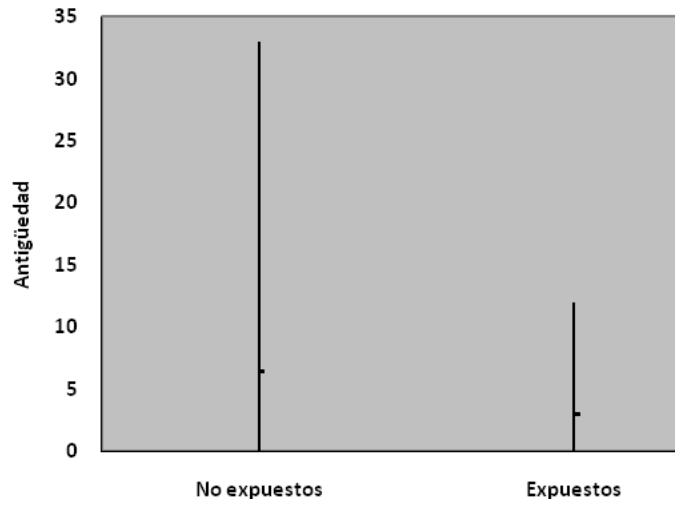
La edad de los trabajadores fue semejante en ambos grupos. Teniendo un valor medio de 35.5 años.

Gráfico 1. Edad de los trabajadores según exposición.



La antigüedad en la empresa fue igual a la antigüedad en el puesto, en todos los casos. El grupo no expuesto tuvo una antigüedad mayor a la de los expuestos; media de 10.3 y 3.4 años, respectivamente.

Gráfico 2. Antigüedad de los trabajadores según exposición.



El nivel medio de consumo de alcohol y de exposición a tabaco fueron semejantes en ambos grupos.

Gráfico 3. Consumo de alcohol por los trabajadores según exposición.

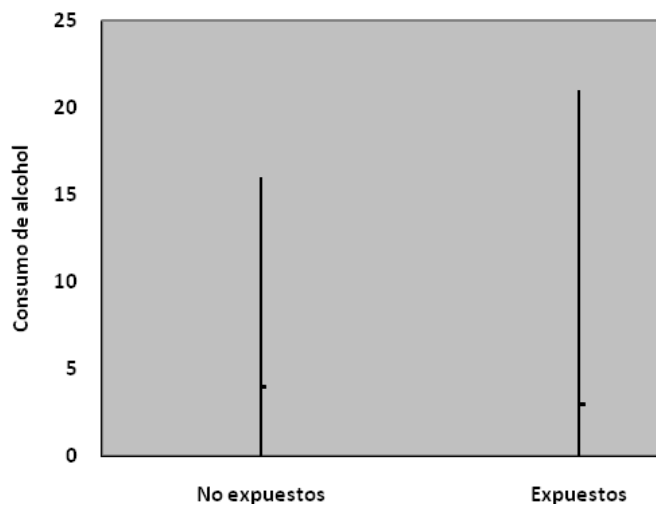
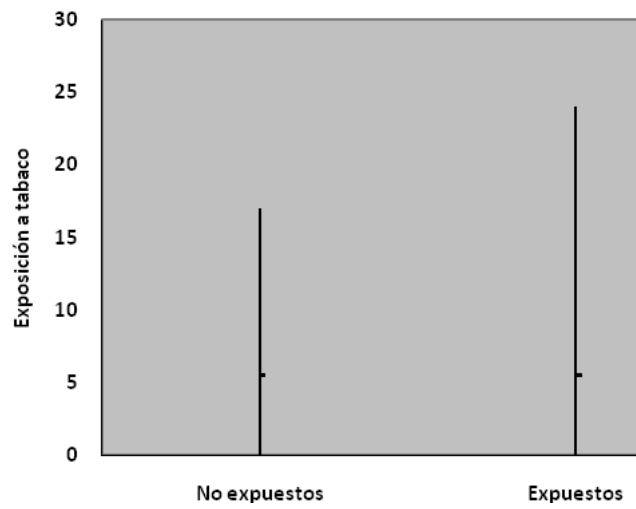


Gráfico 4. Exposición a tabaco de los trabajadores según exposición.



## 6.2 Valores de los indicadores biológicos

Los niveles de glucemia y lipemia fueron semejantes en ambos grupos.

Gráfico 5. Glucemia de los trabajadores según exposición.

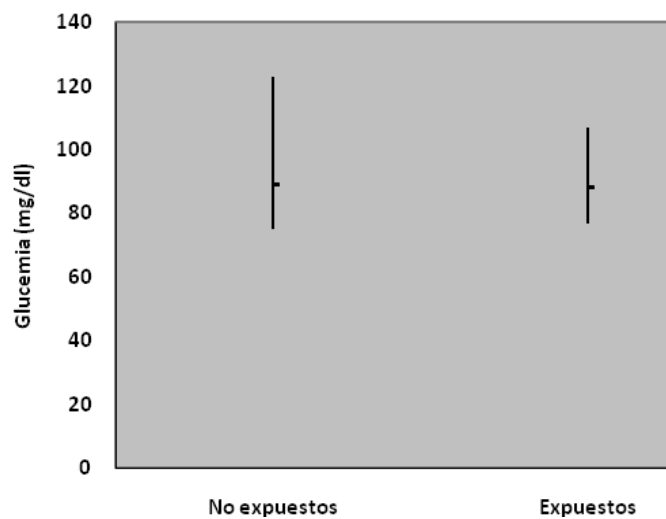




Gráfico 6. Trigliceridemia de los trabajadores según exposición.

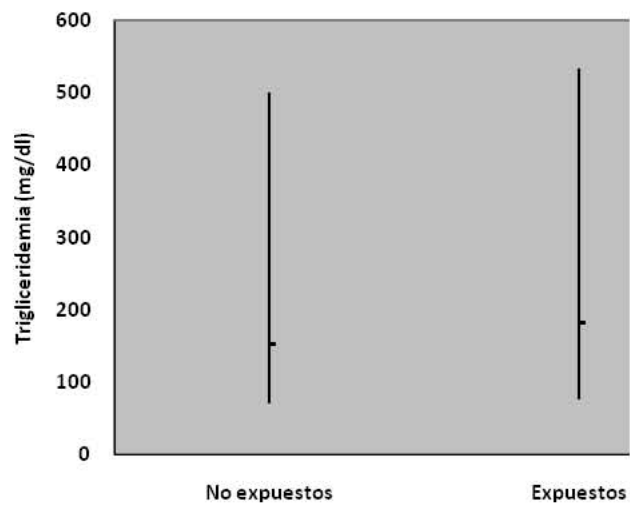
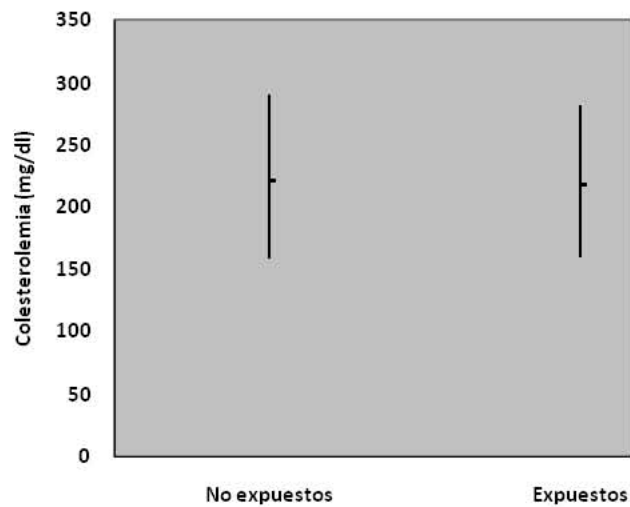
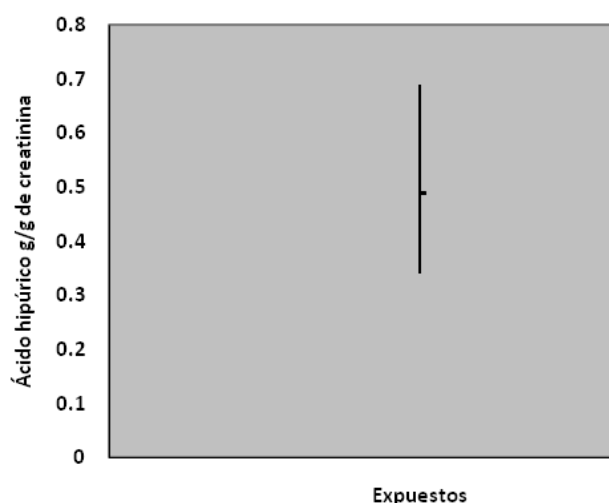


Gráfico 7. Colesterolemia de los trabajadores según exposición.



La concentración mínima de ácido hipúrico en orina fue de 0.34, la máxima de 0.69 g/g creatinina.

Gráfico 8. Concentración de ácido hipúrico en orina.



### 6.3 Niveles de enzimas antioxidantes

No se encontró diferencia, estadísticamente significativa, en los niveles de proteínas antioxidantes de ambos grupos (Tabla 2). Sin embargo es importante hacer notar que se observa una tendencia más clara de diferencias entre los grupos en el caso de la GPx.

Tabla 1. Proteínas antioxidantes los trabajadores según exposición.

	Exposición	N	Rango Promedio	Suma de Rangos
Ceruloplasmina	No expuestos	26	25.71	668.50
	Expuestos	30	30.92	927.50
Total		56		

SOD	No expuestos	9	9.78	88.00
	Expuestos	11	11.09	120.00
	Total	20		
GPx	No expuestos	9	12.78	115.00
	Expuestos	11	8.64	95.00
	Total	20		

Tabla 2. Estadístico de contraste.

	Ceruloplasmina	SOD	GPx
U de Mann-Whitney	317.500	43.000	29.000
Z	-1.230	-.494	-1.559
Sig. asintót. (bilateral)	.219	.621	.119
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]		.656*	.131*

\*No corregidos para los empates.

#### 6.4 Correlación entre Ácido Hipúrico y enzimas antioxidantes.

Sólo la GPx tuvo una correlación significativa con el ácido hipúrico ( $R=0.7$ ). La correlación se mantuvo cuando se estratificó en consumo bajo y consumo alto de alcohol. Cuando se estratificó por consumo bajo de alcohol ( $R=0.74$ ) pero no se observa diferencias con el consumo de tabaco, antigüedad y niveles de colesterol. Sin embargo controlando por edad el efecto se incrementa y al hacerlo por el nivel de triglicéridos el efecto se reduce.

La máxima correlación se obtuvo al estratificar por edad; en menores de 36 años de edad,  $R= 0.959$  ( $p<0.01$ ), en mayores de 35 años  $R= 0.942$  ( $p<0.05$ ).

Tabla 3. Correlación del Ácido Hipúrico y antioxidantes

	Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX	
Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.09	-0.18	<b>0.701*</b>
	Sig. (bilateral)		0.63	0.59	0.02
	N	30	30	11	11

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 4. Tabla de correlaciones según consumo de alcohol.

	Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX		
Consumo de Alcohol Bajo	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	0.03	-0.17	<b>0.74</b>
		Sig. (bilateral)		0.88	0.717	0.06
		N	22	22	7	7
Consumo de Alcohol Alto	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.36	-0.40	0.63
		Sig. (bilateral)		0.38	0.60	0.37
		N	8	8	4	4

Tabla 5. Tabla de correlaciones según consumo de tabaco.

	Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX		
Consumo de Tabaco Bajo	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.13	-0.02	0.69*
		Sig. (bilateral)		0.55	0.95	0.04
		N	23	23	9	9
Consumo de Tabaco Alto	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	0.15	1.00**	1.00**
		Sig. (bilateral)		0.74	.	.
		N	7	7	2	2

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 6. Tabla de correlaciones según antigüedad.

	Ácido hipúrico		Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX
3 años o menos	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	0.02	-0.04	<b>0.84*</b>
		Sig. (bilateral)		0.95	0.94	0.02
		N	17	17	7	7
Más de 3 años	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.21	-0.03	<b>0.95</b>
		Sig. (bilateral)		0.50	0.97	0.05
		N	13	13	4	4

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 7. Tabla de correlaciones según edad.

	Ácido hipúrico		Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX
35 años o menos	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.15	-0.023	<b>0.96**</b>
		Sig. (bilateral)		0.53	0.98	0.00
		N	19	19	6	6
Más de 35 años	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.15	-0.37	<b>0.94*</b>
		Sig. (bilateral)		0.65	0.534	0.02
		N	11	11	5	5

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 8. Tabla de correlaciones según triglicéridos.

	Ácido hipúrico		Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX
Bajo	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	0.18	-0.31	0.69
		Sig. (bilateral)		0.52	0.49	0.08
		N	15	15	7	7
Alto	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.19	-0.12	0.67
		Sig. (bilateral)		0.49	0.88	0.33
		N	15	15	4	4

Tabla 9. Tabla de correlaciones según colesterol.

	Ácido hipúrico		Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX
Bajo	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	0.26	0.23	0.94*
		Sig. (bilateral)		0.44	0.70	0.02
		N	11	11	5	5
Alto	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-0.23	-0.32	0.90*
		Sig. (bilateral)		0.35	0.54	0.02
		N	19	19	6	6

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 10. Tabla de correlaciones según colesterol HDL.

	Ácido hipúrico		Ácido hipúrico	Ceruloplasmina	SOD	GPX
Bajo	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	0.21	0.22	<b>0.76</b>
		Sig. (bilateral)		0.51	0.67	0.08
		N	12	12	6	6
Alto	Ácido hipúrico	Correlación de Pearson	1	-.021	0.12	<b>0.89*</b>
		Sig. (bilateral)		0.41	0.85	0.05
		N	18	18	5	5

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

## 7. Discusión

El tolueno ha sido relacionado en muchos estudios con estrés oxidativo (Singh et al, 2010; Martínez et al., 2010; Karabulut et al., 2009). La ausencia de diferencia en enzimas antioxidantes entre los grupos de esta investigación pudo deberse al criterio de formación de los grupos. El grupo expuesto y el no expuesto se definieron según el Programa de Vigilancia Epidemiológica de la empresa. Dicho programa utiliza como criterio de inclusión al grupo expuesto el desempeñar sus tareas en el área de producción que maneja tolueno como materia prima, pudiendo existir exposición laboral a este u otros disolventes orgánicos en el grupo no expuesto en tareas específicas, como limpieza de la maquinaria y herramienta. Dado que la concentración de ácido hipúrico no fue determinada en el grupo no expuesto, las diferencias entre los grupos podrían ser borradas.

Modelos de exposición laboral como el presente tienen la limitación de no poder controlar muchos factores de confusión. La dieta (Villanueva, et al., 1994), contaminación ambiental, exposición en un segundo trabajo o pasatiempo, entre otros, puede influir en los niveles de ácido hipúrico. En esta investigación la exposición en un segundo trabajo o pasatiempo no existió según el expediente médico, la exposición ambiental se considera homogénea y la dieta puede presentar variaciones a pesar que los empleados consumen los mismos alimentos en su comida principal en la empresa. Aún con las limitaciones señaladas la magnitud de la correlación entre ácido hipúrico y GPx fue importante y se conservó al estratificar por los diversos factores de

confusión contemplados, observado además interacción con la edad y el nivel de triglicéridos.

Todas las investigaciones concuerdan en el aumento de radicales y marcadores de daño oxidativo por exposición a tolueno. Algunas investigaciones han encontrado disminución de GPx tras exposición a tolueno (El-Nabi et al., 2008; Karabulut et al., 2009), mientras otras han reportado su aumento (Kodavanti, 2011). Lo anterior podría deberse a una reacción de inducción-fatiga de los mecanismos antioxidantes. En la investigación aquí presentada se encontró correlación positiva. El máximo permisible según la legislación nacional es de 1.6 g/g de creatinina, equivalente en una exposición a 50 ppm de tolueno por 40 horas a la semana. El ácido hipúrico en orina máximo en el presente estudio fue de 0.7 g/g de creatinina, indicando que estos trabajadores recibieron una dosis de tolueno relativamente moderada. Con lo anterior se puede inferir que estos trabajadores se encontraban en la fase de inducción enzimática.

En el presente estudio la edad parece influir en la correlación de ácido hipúrico con GPx. Esta diferencia es consistente con lo reportado en otros estudios. Se ha visto en modelos animales mayor respuesta antioxidante en organismos más jóvenes (Kodavanti, 2011) y menor excreción de ácido hipúrico tras la exposición a tolueno en humanos jóvenes respecto a su contraparte (Siqueira, et al, 2002). Es remarcable el hecho que el consumo de alcohol o tabaco no afectan la excreción de ácido hipúrico (Siqueira, et al, 2002) pero aun así se estratificó para que no influyeran en los niveles de enzimas antioxidantes.



A pesar del reducido tamaño de la muestra, la magnitud de la correlación entre ácido hipúrico y GPx fue importante. Al parecer la GPx es la primera enzima antioxidante en responder a la exposición laboral a tolueno en concentración moderada.

Más investigaciones en condiciones laborales reales son necesarias antes de poder sugerir vigilar las enzimas antioxidantes como parte del monitoreo biológico de exposición a tolueno.

## Anexos

### A. Plan de manejo estadístico.

<b>Hipótesis</b>	<b>Variabes</b>	<b>Prueba estadística</b>
La ceruloplasmina se encuentra más elevada en los expuestos a tolueno que en los no expuestos.	<i>Independiente:</i> Exposición a tolueno (Cualitativa)  <i>Dependiente:</i> Ceruloplasmina (Cuantitativa)	U-Mann-Whitney
La SOD se encuentra más elevada en los expuestos a tolueno que en los no expuestos.	<i>Independiente:</i> Exposición a tolueno (Cualitativa)  <i>Dependiente:</i> SOD (Cuantitativa)	U-Mann-Whitney
La GPx se encuentra disminuida en los expuestos a tolueno respecto a los no expuestos.	<i>Independiente:</i> Exposición a tolueno (Cualitativa)  <i>Dependiente:</i> GPx (Cuantitativa)	U-Mann-Whitney
La ceruloplasmina se asocia en forma positiva con el ácido hipúrico en los expuestos.	<i>Independiente:</i> Ácido hipúrico en orina (Cuantitativa)  <i>Dependiente:</i> Ceruloplasmina (Cuantitativa)	Prueba de correlación de Pearson
La SOD se asocia en forma positiva con el ácido hipúrico en los expuestos.	<i>Independiente:</i> Ácido hipúrico en orina (Cuantitativa)  <i>Dependiente:</i> SOD (Cuantitativa)	Prueba de correlación de Pearson
La GPx se asocia en forma positiva con el ácido hipúrico en los expuestos.	<i>Independiente:</i> Ácido hipúrico en orina (Cuantitativa)  <i>Dependiente:</i> GPx (Cuantitativa)	Prueba de correlación de Pearson

## B. Descripción de Métodos de Laboratorio.

### I. Determinación de colesterol.

#### Material.

- Espectrofotómetro
- Pipetas
- Baño de temperatura a 37° C
- Cubetas
- Agitador (tipo Vortex)
- Cronómetro
- Tubos de ensaye
- Centrífuga

#### Reactivos.

Colesterol Enzimático (Líquido):el reactivo contiene los siguientes ingredientes activos a esta concentración.

4-Aminofenazona.....	0.25 mmol/L
Fenol.....	25.0 mmol/L
Peroxidasa.....	>5.0 U/mL
Colesterol estearasa.....	>0.15 U/mL
Colesteroloxidasa.....	>0.2 U/mL

#### Reguladores y estabilizadores.

Estándar de Colesterol (200 mg/dL):solución acuosa de colesterol con estabilizadores, surfactantes y conservadores.

#### Recolección y preparación de la muestra.

La sangre debe ser colectada seguida de 12 horas de ayuno.  
La muestra puede ser suero o plasma colectado con EDTA como anticoagulante.  
Evitar hemólisis.

#### Estabilidad de la muestra.

El colesterol total y el colesterol HDL se reportan estables durante 4 días a 2-8° C, -20° C alcanzan una mayor estabilidad hasta por 3 meses para el colesterol total y 7-14 días para el HDL. De ser posible la muestra debe separarse y analizarse el mismo día de su extracción.

## Sustancias interferentes.

Los anticoagulantes como fluoruros y oxalatos dan valores bajos falsos. La prueba no se interfiere con valores de hemoglobina de hasta 200 mg/dL o por bilirrubina hasta de 10 mg/dL. Sin embargo, muestras muy ictericas y hemolizadas se pueden corregir usando un blanco de suero o plasma.

## Método.

1. Pipetear en cubetas o tubos de ensayo marcados como RB (Blanco de Reactivo), E (Estándar) y M (Muestra) los siguientes volúmenes (en mL), mezclar bien. Como se observa en el cuadro A.

Tabla A. Curva estándar

	RB	E	M
Reactivo de color	1.0	1.0	1.0
Estándar	-	0.01	-
Muestra	-	-	0.01

2. Incubar todas las cubetas a 37° C por 5 minutos o por 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Leer la absorbancia (A) del E y la M frente al blanco de reactivo (RB) a 500 nm dentro de 60 minutos

Nota: Los volúmenes pueden ser incrementados al doble si el instrumento requiere un volumen mayor a 1.0 mL para realizar la lectura.

## Control de calidad.

Utilizar un suero control comercial o un pool de sueros previamente analizados y divididos en alícuotas congeladas en cada serie de ensayos.

## Resultados.

Los valores se derivan de los siguientes cálculos:

$$\text{Colesterol total en suero (mg/dL)} = \frac{AM}{AE} \times 200$$

Donde AM y AE son los valores de absorbancias de la muestra y del estándar respectivamente y 20 es la concentración del estándar (mg/dL).

Cuando se requiera de un blanco de suero (muestra icterica o hemolizada) incluir otro tubo como BM (véase procedimiento).

Añadir 1.0 mL de solución salina, 0.01 mL de suero, mezclar por inversión, transferir a la cubeta y leer la absorbancia (Abs) contra agua destilada a 500 nm. Usar estos valores para corregir los de la muestra como sigue:

$$\text{Colesterol total en suero (mg/dL)} = \frac{\text{AM} - \text{Abs}}{\text{AE}} \times 200$$

Nota: La muestra con valores de colesterol mayores a 750 mg/dL se diluyen tres veces (1+2) con solución salina normal (cloruro de sodio 8.5 g/dL), se repite el ensayo y el resultado se multiplica por 3.

## II. Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial.

### Material.

- Balanza analítica
- Probeta de 50 mL
- Matraz Erlenmeyer
- 6 tubos de ensayo de 13X100
- Baño María
- Placas Falcon de 6 pozos.

### Método.

#### Preparación de las placas

1. Se utiliza agarosa al 1 %.
2. Pesarse 0.3 g de agarosa, depositar en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y adicionar 30 mL de PBS.
3. Introducir el matraz en un horno de microondas, dar ciclos cada 10 segundos hasta observar el agar completamente disuelto, cuidando que no se derrame.
4. Colocar 6 tubos de ensayo de 13X100 en un baño María a 45° C.
5. Adicionar 2 mL de agarosa al 1% en cada tubo.
6. Verter en cada tubo 150  $\mu$ L de suero de conejo anti-ceruloplasmina humana, agitar con un Vortex.
7. Vaciar cada uno de los tubos en los pozos de las placas de 35mm Falcon.
8. Permitir la solidificación de las placas a temperatura ambiente.
9. Realizar 4 perforaciones de 3 mm en cada uno de los 6 pozos de la placa Falcon, se adiciona 5  $\mu$ L de estándares de ceruloplasmina humana a concentración de 15, 30, 45 y 60 mg/dL, para realizar la curva de calibración.
10. En otra placa se colocan 5  $\mu$ L de las muestras, se dejan en refrigeración por 48 hs, se miden los halos de inhibición y se interpolan en la curva de calibración.

## C. Instrumentos y consentimiento informado

### Cuestionario para consumo de alcohol:

#### PREGUNTAS Y ALTERNATIVAS DE RESPUESTA DEL CUESTIONARIO AUDIT

	0	1	2	3	4
1. ¿Con qué frecuencia toma bebidas alcohólicas?	Nunca	Cada mes o menos	2 a 4 veces al mes	2 o más veces a la semana	4 o más veces a la semana
2. ¿Cuántas copas toma en un día?	1 a 2	3 a 4	5 a 6	7 a 9	10 o más
3. ¿Con qué frecuencia toma seis o más copas en una sola ocasión?	Nunca o casi diario?	Menos de una vez al mes	Una vez al mes	Una vez a la semana	Diario o casi diario.
4. ¿Cuántas veces en el último año notó que una vez que comenzó a tomar ya no podía parar?	Nunca o casi diario?	Menos de una vez al mes	Una vez al mes	Una vez a la semana	Diario o casi diario.
5. ¿Cuántas veces en el último año el tomar bebidas alcohólicas interfirió con sus actividades normales?	Nunca o casi diario?	Menos de una vez al mes	Una vez al mes	Una vez a la semana	Diario o casi diario.
6. ¿Cuántas veces en el último año tuvo que tomar un primer trago por la mañana para poder funcionar después de haber tomado el día anterior?	Nunca o casi diario?	Menos de una vez al mes	Una vez al mes	Una vez a la semana	Diario o casi diario.
7. ¿Cuántas veces en el último año tuvo remordimiento o sentimientos de culpa después de tomar bebidas alcohólicas?	Nunca o casi diario?	Menos de una vez al mes	Una vez al mes	Una vez a la semana	Diario o casi diario.
8. ¿Cuántas veces en el último año no ha podido recordar lo que pasó la noche anterior debido a que tomó bebidas alcohólicas?	Nunca o casi diario?	Menos de una vez al mes	Una vez al mes	Una vez a la semana	Diario o casi diario.
9. Debido a que tomó bebidas alcohólicas, ¿usted o alguien ha resultado lastimado?	No		Si, pero no en el último año		Si, durante el último año
10. ¿Existe algún amigo, pariente o médico que conozca su consumo de bebidas alcohólicas o que le haya sugerido suspenderlo?	No		Si, pero no en el último año		Si, durante el último año

## Cuestionario para exposición a tabaco:

### CONSUMO DE TABACO

	0	1	2	3	4
1. ¿Con qué frecuencia la gente que está en el mismo sitio que usted se encuentra fumando?	Nunca	Cada mes o menos	2 a 4 veces al mes	2 o 3 veces a la semana	4 o más veces por semana
2. ¿Con qué frecuencia consume tabaco (en cualquier presentación)?	Nunca	Cada mes o menos	2 a 4 veces al mes	2 o 3 veces a la semana	4 o más veces por semana
3. ¿Cuántos cigarrillos, puros o pipas fumó en los últimos 30 días?	0 a 5	6 a 24 (2 a 6 a la semana)	25 a 150 (1 a 5 al día)	151 a 570 (6 a 19 al día)	Más de 570 (20 o más al día)
4. ¿Con qué frecuencia fuma 10 o más cigarrillos, puros o pipas en un mismo día?	Nunca	Una vez al mes o menos	2 a 4 veces al mes	2 a 6 veces por semana	Diario
5. ¿Qué presentación de tabaco consume?	Ninguno	Cigarrillo sin filtro	Cigarrillo con filtro	Masticado, inhalado u otro	Puro o pipa
6. ¿Cuántos años ha consumido tabaco en su vida?	0	Hasta 5	6 a 10	11 a 20	Más de 20
7. ¿Cuánto tiempo tiene de haber suspendido el consumo de tabaco?	Nunca he fumado / Más de 10 años	Más de 5 años	De 6 meses a 5 años	Menos de 6 meses	No lo he suspendido

### Consentimiento informado:

Acepto participar en la investigación "Análisis de estrés oxidativo por exposición laboral a tolueno en una fábrica de plásticos de la Ciudad de México" para lo que, adicional a estos cuestionarios, me extraerán 10 ml de sangre, me han explicado los riesgos y los he comprendido.

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_



## **Bibliografía**

1. Altamura, C., Squitti, R., Pasqualetti, P., Gaudino, C., Palazzo, P., Tibuzzi F., et al. (2009). Ceruloplasmin/Transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke*, 40 (4), 1282-1288.
2. Busutil, R.A., Garcia, A.M., Cabrera, C., Rodriguez A., Suh Y., Kim W.H., et al. (2005). Organ-specific increase in mutation accumulation and apoptosis rate in CuZn-superoxide dismutase-deficient mice. *Cancer Res*, 65 (24), 11271-11275.
3. Cavalcante, A.G., de Bruin, P.F. (2009). The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol*, 35 (12), 1227-1237.
4. Chang, T.Y., Wang, V.S., Hwang, B.F., Yen, H.Y., Lai, J.S. Liu, C.S., et al. (2009). Effects of Co-exposure to Noise and Mixture of Organic Solvents on Blood Pressure. *J Occup Health*, 51 (4), 332-339.
5. Coskun, O., Oter, S., Korkmaz, A., Armutcu, F., Kanter, M. (2005). The oxidative and morphological effects of high concentration chronic toluene exposure on rat sciatic nerves. *Neurochem Res*, 30 (1), 33-38.
6. Costa, C., Pasquale, R.D., Silvani, V., Barbaro, M., Catania, S. (2006). In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol In Vitro*, 20 (3), 324-331.
7. Ehrenwald, E., Fox, P.L. (1993). Isolation of Nonlabile Human Ceruloplasmin by Chromatographic Removal of a Plasma Metalloproteinase. *Arch Biochem Biophys*, 309 (2), 392-395.
8. El-Nabi, M.A., Shehata, M. (2008). Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *Br J Biomed Sci*, 65 (2), 75-79.
9. European Commission- Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection European Chemical Bureau (2003). European Union Risk Assessment Report toluene. Series: 2nd Priority List Vol:30, 103-203.
10. Gopal, K.V. (2008). Audiological findings in individuals exposed to organic solvents: Case studies. *Noise Health*, 10 (40), 74-82.
11. Gordon, C.J., Gottipolu, R.R., Kenyon, E.M., Thomas, R., Schladweiler, M.C., Mack, C.M., et al. (2010). Aging and susceptibility to toluene in rats: a pharmacokinetic, biomarker, and physiological approach. *J Toxicol Environ Health A*, 73 (4), 301-318.

12. H. Congreso de la Unión. (1970). Ley Federal del Trabajo. México: H. Congreso de la Unión.
13. Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142 (2), 231-255.
14. Inoue, O., Kawai, T., Ukai, H., Maejima, Y., Fukui, Y., Ohashi, F., et al. (2008). Limited Validity of o-Cresol and Benzylmercapturic Acid in Urine as Biomarkers of Occupational Exposure to Toluene at Low Levels. *Industrial Health*, 46 (4), 318–325.
15. Karabulut, I., Balkanci, Z.D., Pehlivanoglu, B., Erdem, A., Fadillioglu, E. (2009). Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions with assessment of oxidant/antioxidant status. *Toxicol Ind Health*, 25 (8), 545-550.
16. Kodavanti P.R., Royland J.E., Richards J.E., Besas J., Macphail R.C. (2011). Toluene effects on oxidative stress in brain regions of young-adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. *Toxicol Appl Pharmacol*.
17. Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C. (2009). Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicol Sci*. 107 (2), 473-81.
18. Martínez, M., Cárabez, A., Gallegos, M.A., Pedraza, G., Hernández, N.G., Leo, G.E. (2010). Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *J Appl Toxicol*, 30 (3), 226-232.
19. Mattia, C., LeBel, C., Bondy, S. (1991). Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol*, 42(4), 879-882.
20. Meier-Ewert, H.K., Ridker, P.M., Rifai, N., Price, N., Dinges, D.F., Mullington, J.M. (2001). Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem*, 47, 426–430.
21. Myhre, O., Vestad, T., Sagstuen, E., Aarnes, H., Fonnum, F. (2000). The effects of aliphatic (n-nonane), naphthenic (1,2, 4-trimethylcyclohexane), and aromatic (1,2,4-trimethylbenzene) hydrocarbons on respiratory burst in human neutrophil granulocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 167 (3), 222-30.

22. Nakai, N., Murata, M., Nagahama, M., Hirase, T., Tanaka, M., Fujikawa, T., et al. (2003). Oxidative DNA damage induced by toluene is involved in its male reproductive toxicity. *Free Radic Res*, 37 (1), 69-76.
23. Paradise, W.A., Vesper, B.J., Goel, A., Waltonen, J.D., Altman, K.W., Haines, G.K., et al. (2010). Nitric oxide: perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin. *Int J Mol Sci*, 11 (7), 2715-2745.
24. Pepys, M.B., Hirschfield, G.M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 111 (12), 1805-1812.
25. Satoh, K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by new colorimetric method. *Clin Chim Acta*, 90 (1), 37-43.
26. Serin, G., Ulutas, P.A. (2010). Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrous bitches after ovariohysterectomy. *Vet Rec*, 166 (1), 20-22.
27. Singh, M.P., Ram, K.R., Mishra, M., Shrivastava, M., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K. (2010). Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. *Chemosphere*, 79(5), 577-587.
28. Siqueira, M.E., Paiva, M.J. (2002). Hippuric acid in urine: reference values. *Rev Saúde Pública*, 36(6), 723-727.
29. Skesters, A., Zvagule, T., Silova, A., Rusakova, N., Larmane, L., Reste, J., et al. (2010). Biochemical observations relating to oxidant stress injury in Chernobyl clean-up workers ("liquidators") from Latvia. *Inflammopharmacology*, 18 (1), 17-23.
30. Srivatsan, R., Das, S., Gadde, R., Manoj-Kumar, K., Tadar, S., Rao, N., et al. (2009). Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications. *Arch Iran Med*, 12 (2), 121-127.
31. Suzuki, S., Suzuki, K., Hirata, K. (2009). Brain Magnetic Resonance Imaging in Chronic Trichloroethylene and Toluene Exposure. *Intern Med*, 48 (10), 861-862.
32. Tapryal, N., Mukhopadhyay, C., Das, D., Fox, P.L., Mukhopadhyay, C.K. (2009). Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA decay mechanism involving its

3'-untranslated region: implications in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem*, 284 (3),1873-1883.

33. Ukai, H., Kawai, T., Inoue, O., Maejima, Y., Fukui, Y., Ohashi, F., et al. (2007). Comparative evaluation of biomarkers of occupational exposure to toluene. *Int Arch Occup Environ Health*, 81 (1), 81-93.
34. Villanueva, M.B., Jonai, H., Kanno, S., Yakeuchi, Y. (1994). Dietary Sources and Background Levels of Hippuric Acid in Urine: Comparison of Philippine and Japanese Levels. *Industrial Health*, 32, 239-246.
35. Yapur, V., Bustos, M.F., González, A.S., Negri, G.A. (2007). Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 41 (3), 347-351.