



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral (MNxl) de enfermeras expuestas a quimioterapéuticos: Estudio Longitudinal

TESIS

Para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA

Armando García Velasco

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Elia Roldán Reyes



CIUDAD DE MÉXICO

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme un espacio para el estudio y desarrollo profesional.

Para la *Facultad de Estudios Superiores * Zaragoza **, por permitirme terminar con mis estudios profesionales y científicos en la carrera de **Biología**.

Para mi **Madre y Padre**, cuyo apoyo me mantuvo hasta el termino de mi carrera profesional.

A **Rafael**, por ser un buen hermano.

A mis **amigos y amigas**, que no se rindieron conmigo.

Y a mis **primos** favoritos.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de *Citogenética y Mutagénesis* (LI-FESZ-350115), integrante de la **Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, (UMIEZ-CII)**, bajo la dirección de la Dra. Elia Roldán Reyes.

Agradecimientos

A la UNAM, por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme conocimiento científico para mi desarrollo profesional.

A la Dra. Elia Roldán Reyes por su compromiso, paciencia y enseñanzas otorgadas para el desarrollo de la presente investigación. Así como su experiencia transmitida para el desarrollo profesional y personal de este investigador.

A la Dra. Ma. Lilia Alicia Alcántar Zavala, por permitirme integrarme en el desarrollo del actual proyecto de investigación que este trabajo presenta. Así como brindarme el material, financiamiento y la información requerida para su desarrollo y termino.

De manera especial, quiero agradecer a los y las enfermeras de las distintas instituciones del Sector Salud público que formaron parte del estudio, y cuya colaboración permitió el desarrollo del actual proyecto de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio 2 primer piso de la UMIEZ, por todos los momentos compartidos.

A la Dra. Loa, por sus observaciones en los momentos que los necesitaba

FINANCIAMIENTO:

- ✓ UNAM-PAPIIT Proyecto IN-221919-3.
- ✓ Dra. Ma. Lilia Alicia Alcantar Zavala, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Morelia Michoacán.

Resumen

Los agentes antineoplásicos son ampliamente utilizados en el tratamiento de cáncer y algunas enfermedades no neoplásicas. Hoy en día se conocen más de 50 diferentes fármacos antineoplásicos. Considerando el mecanismo de acción de estos fármacos antineoplásicos, no es sorprendente que muchas personas involucradas en el cuidado de la salud, especialmente enfermeras que los manipulan, preparan y administran estén preocupadas acerca de los efectos que estos fármacos puedan tener en su salud (Olsen *et al.*, 1994). Existen diferentes biomarcadores de efecto para monitorear el riesgo. Uno de ellos es el **Ensayo de Micronúcleos en Células Exfoliadas de la Mucosa Oral (MNxl)**, es un método mínimamente invasivo y de fácil obtención, el cual, a través de la colecta de células orales, se observa si existe daño al material genético nuclear a través de la presencia de micronúcleos. Los micronúcleos son fragmentos o cromosomas enteros que no alcanzaron los polos del huso durante la mitosis y permanecen encapsulados en la telofase en un núcleo separado (Kashyap *et al.*, 2012), evidenciando daño genotóxico. En el presente estudio se usó el ensayo de micronúcleos de células exfoliadas orales de la mucosa oral, para determinar si existe riesgo por exposición ocupacional a agentes antineoplásicos. Se muestrearon 15 enfermeras no expuestas (grupo control) y 12 enfermeras expuestas a través de los años 2016, 2017 y 2018. Se colectaron las células orales a través de un raspado y se realizó un frotis en un portaobjetos para su posterior fijación con spray citológico. Las células fueron teñidas siguiendo el procedimiento modificado de Thomas *et al.*, (2009) usando la tinción Feulgen-Light Green. Los resultados fueron analizados estadísticamente usando “*t*” *de student* ($p < 0.05$). En el seguimiento efectuado al personal de enfermería en los años 2016, 2017 y 2018, se observó daño al material genético nuclear representado por yemas nucleares, así como daño citostático por células binucleadas, y daño citotóxico por células picnóticas y cariolíticas. Conclusiones: En el presente estudio, se encuentra que existe persistencia de daño genotóxico, citostático y citotóxico por la exposición a agentes antineoplásicos a 1, 2 y 3 años de la primera evaluación reportada por Alcántar Zavala, (2015).

Palabras clave: Genotoxicidad, yemas nucleares, células exfoliadas antineoplásicos.

Índice

1. Introducción.....	5
1.1 Agentes antineoplásicos de exposición.....	6
1.2 P53 y el daño al material genético.....	15
1.3 Tejido epitelial bucal.....	16
1.4 Ensayo de micronúcleos (MNxl).....	18
1.5 Criterios para la clasificación de las células exfoliadas de la mucosa oral.....	19
2 Antecedentes.....	21
3 Justificación.....	23
4 Hipótesis.....	23
5 Objetivos.....	23
6 Métodos.....	24
6.1 Análisis estadístico.....	25
7 Resultados.....	26
8 Discusión.....	31
9 Conclusiones.....	36
10 Referencias bibliográficas.....	37
11 Anexos.....	41

Introducción

El efecto mutagénico y carcinogénico de agentes genotóxicos en poblaciones humanas que están expuestos ocupacionalmente ha sido una preocupación creciente. En una rutina hospitalaria se utilizan varios agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del paciente. Sin embargo, para los profesionales que están continuamente expuestos a estos agentes, los riesgos deben ser evaluados con el fin de establecer una gestión adecuada, debido a que los trabajadores que manipulan preparan y/o administran fármacos antineoplásicos también pueden padecer de sus efectos (Kopjar *et al.*, 2009). Las vías primarias de exposición en personas no protegidas incluyen absorción dérmica, ingestión e inhalación resultantes de dispersión de polvo o líquido durante la reconstitución y derrame durante la preparación o administración a pacientes.

Los agentes antineoplásicos son ampliamente usados en el tratamiento de cáncer y algunas enfermedades no neoplásicas. Actualmente más de 50 diferentes fármacos antineoplásicos son usados. Estos pueden ser divididos en agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, generadores de radicales libres e inhibidores de la Topoisomerasa II. Estos agentes antineoplásicos incluyen químicos con actividad de bloqueo de crecimiento celular, lo que resulta en la muerte de células en división (Bouraoui *et al.*, 2011).

La quimioterapia contra el cáncer ha dado especial énfasis a las preocupaciones sobre la posible **exposición del personal que maneja agentes anticancerígenos ocupacionalmente** (Sorsa, 1996; Ursini *et al.*, 2019). Considerando el mecanismo de estos fármacos antineoplásicos, no es sorprendente que muchas personas involucradas en el cuidado de la salud, especialmente enfermeras que manipulan, preparan y administran estén preocupadas acerca de los efectos que

estos fármacos puedan tener en su salud (Burgaz *et al.*, 1999, Roussel *et al.*, 2017; Ursini *et al.*, 2019). Debido a esto, en los pasados años varios reportes han proporcionado evidencia para determinar los riesgos a la salud del personal de Hospital encargados en la administración y preparación de estos fármacos, incluyendo riesgo de cáncer (Ursini *et al.*, 2019). Por otro lado, estudios de los efectos genotóxicos han producido resultados ambiguos. En particular, algunos estudios reportan una correlación positiva entre exposición y el daño al ADN cromosomal, y la ausencia de sus efectos. Estas discrepancias pueden ser consecuencia de diferentes tiempos de exposición, así como uso apropiado del equipo de protección y precauciones de seguridad (Cornetta *et al.*, 2008).

Muchos fármacos contra el cáncer son tóxicos para las células que se dividen rápidamente, al menos en parte debido a su capacidad para acceder al núcleo, dañar químicamente el ADN e interferir con la replicación del ADN, la reparación y los procesos de segregación cromosómica durante la división celular. Los estudios de mutagenicidad en células somáticas han demostrado la inducción de mutaciones genéticas, rupturas cromosómicas, reordenamientos, y aneuploidía de muchos de estos agentes quimioterapéuticos (Witt y Bishop, 1998; Roussel *et al.*, 2017).

Agentes antineoplásicos de exposición

En la tabla 1 se muestran los antineoplásicos a los que nuestro grupo de estudio, las 12 enfermeras, estuvieron expuestas ocupacionalmente durante los tres años en los que se realizó las evaluaciones.

Tabla 1. Los quimioterapéuticos a los que estuvo expuesto nuestro grupo de estudio

Agente quimioterapéutico	Modo de acción
Ciclofosfamida	Agente alquilante
Ifosfamida	Agente alquilante
Metotrexato	Antimetabolito
Cisplatino	Agente alquilante
Doxorubicina	Generador de radicales libres
Bleomicina	Radiomimético

Ciclofosfamida e Ifosfamida

La ciclofosfamida e ifosfamida son solubles en agua, salina o alcohol y como monohidrato pueden ser administrados oralmente. La biodisponibilidad de la **ciclofosfamida** es del 85-100% y una fracción del medicamento es metabolizado en el hígado. Similarmente, la **ifosfamida** es rápidamente absorbida a través del tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad de casi el 100%. Ambos compuestos son altamente hidrofílicos y no se difunden rápidamente a través de la bicapa lipídica de las células. Los metabolitos citotóxicos inestables respectivos de la

ciclofosfamida e ifosfamida, tienen una carga negativa con un pKa de 4,5 a pH fisiológico y, por lo tanto, es relativamente difícil que pasen la membrana celular.

Como profármaco, el hígado en el cuerpo convierte la ciclofosfamida en mostaza alquilante activa. La activación inicial de la ciclofosfamida es la 4-hidroxilación en C4 del anillo de oxazafosforina para formar 4-OH-ciclofosfamida. Múltiples enzimas CYP450, incluidas CYP2B6, CYP2C9 y CYP3A4 en el hígado, son responsables de la 4-hidroxilación. El 4-OH-ciclofosfamida es un importante metabolito circulante que ingresa a las células tumorales y se descompone a través de su tautómero aldofosfamida (un intermedio aldehído) por eliminación espontánea para formar la mostaza fosforamida citotóxica (**Figura 1**). La mostaza de fosforamida resultante es un alquilador del ADN y el metabolito citotóxico definitivo (Zhang *et al.*, 2006; Vredenburg *et al.*, 2015; Helsby *et al.*, 2019).

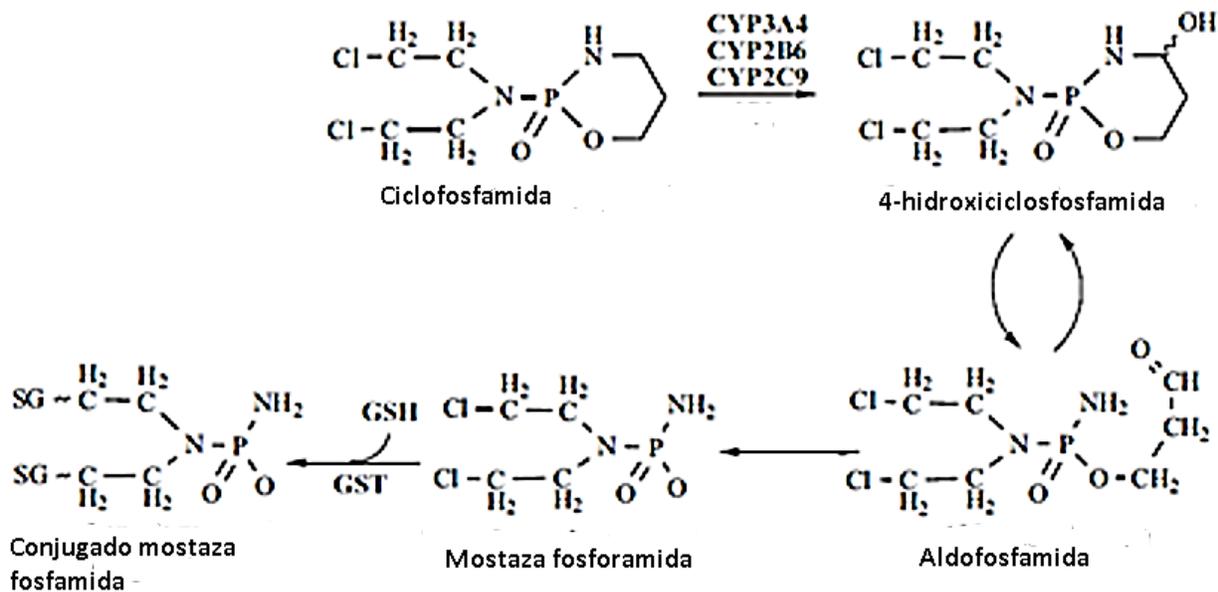


Figura 1. Metabolismo de la ciclofosfamida. Este antineoplásico es activado en el hígado CYP2B6, CYP3A4 y CYP2C9 para formar 4-hidroxiciclofosfamida, que ingresa a la sangre y se transporta a las células tumorales por los eritrocitos. Este compuesto está en equilibrio con su tautómero aldofosfamida que puede descomponerse para formar mostaza fosforamida citotóxica (Modificada de Zhang *et al.*, 2006; Vredenburg *et al.*, 2015; Helsby *et al.*, 2019).

El metabolismo de la **ifosfamida** es similar al de la **ciclofosfamida**, pero existen algunas diferencias en la extensión de la formación de ciertos metabolitos, porque la ifosfamida difiere estructuralmente de la ciclofosfamida en la posición de un grupo cloroetilo. Al igual que la ciclofosfamida, la ifosfamida se activa a través de la 4-hidroxilación por el CYP2B6 y el CYP3A4 para formar la mostaza de ifosforamida citotóxica. La 4-OH-ifosfamida se metaboliza a sus metabolitos inactivos 4-ceto-ifosfamida por el alcohol deshidrogenasa (ADH) y 4-tio-ifosfamida con conjugación de glutatión (GSH) reducido a través de las glutatión transferasas (GST) (**Figura 2**). La mostaza de ifosforamida es el metabolito alquilante final de la ifosfamida, que puede formar un enlace covalente con la molécula de ADN y causar enlaces cruzados entre las cadenas de ADN (Zhang *et al.*, 2006; Vredenburg *et al.*, 2015).

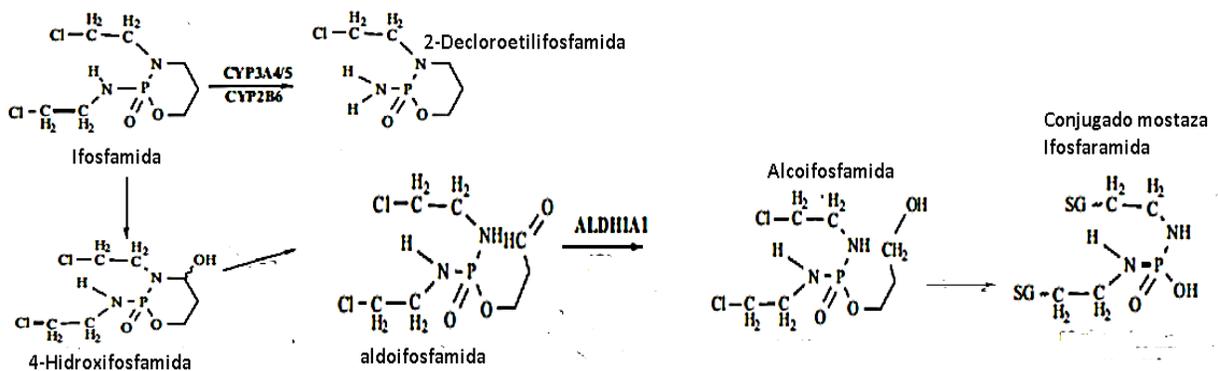


Figura 2. Metabolismo de la ifosfamida. Como profármaco, la ifosfamida se activa a través de la 4-hidroxilación para formar 4-hidroxifosfamida que se inactiva para formar 4-cetoifosfamida por alcohol deshidrogenasa (ADH) y 4-tioifosfamida con conjugación de glutatión reducido. El tautómero de 4-hidroxifosfamida, aldoifosfamida, se puede convertir en carboxifosfamida por ALDH1A1 y la alcoifosfamida por aldo-ceto reductasa. Alternativamente, la aldoifosfamida puede descomponerse para generar mostaza de ifosforamida citotóxica (Modificada de Zhang *et al.*, 2006; Vredenburg *et al.*, 2015).

Metotrexato

El metotrexato o ametopterina, un análogo del ácido fólico, es un ácido orgánico débil, con un peso molecular de 454 daltons, cargado negativamente a pH neutro y con una solubilidad

limitada de los lípidos. En general, el metotrexato se transporta activamente a las células, excepto cuando los mecanismos de transporte activo pueden estar saturados y predomina la difusión pasiva. Una vez intracelular, el metotrexato se une competitivamente con la dihidrofolato reductasa. Esta reacción es crítica para la reproducción celular porque la dihidrofolato reductasa es la única enzima capaz de catalizar la conversión de dihidrofolato a la forma activa de tetrahidrofolato. Un suministro continuamente renovado de N-metileno tetrahidrofolato es un cofactor necesario que proporciona fragmentos de carbono individuales para la timidilato sintetasa para convertir 2-desoxiuridilato en timidilato (**Figura 3**) (Olsen, 1991; Brown *et al.*, 2016).

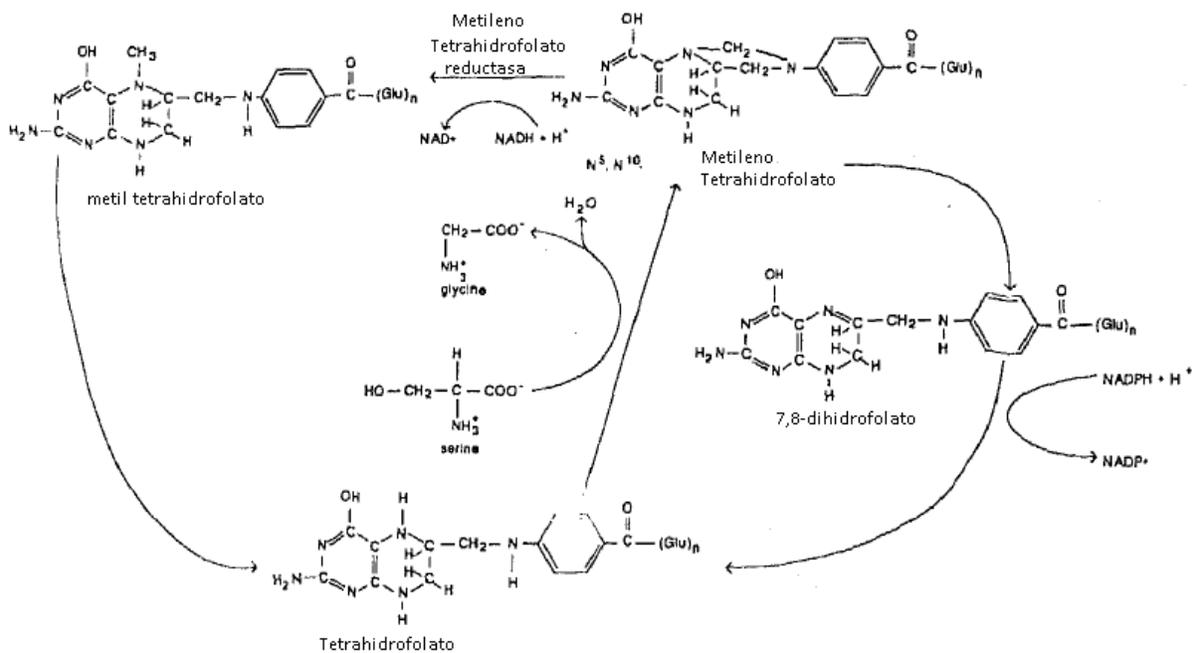


Figura 3. Ciclo de la formación de tetrahidrofolato, compuesto esencial para la formación del ácido fólico (Tomada de Olsen, 1991; Brown *et al.*, 2016).

Cisplatino

Está ampliamente aceptado que el principal mecanismo bioquímico de acción del cisplatino implica la unión del fármaco al ADN en el núcleo celular y la posterior interferencia con la transcripción normal y / o los mecanismos de replicación del ADN. Estas interrupciones pueden desencadenar procesos citotóxicos que conducen a la muerte de la célula cancerosa. Después de la administración intravenosa al paciente, el cisplatino se difunde rápidamente en los tejidos y está muy unido a las proteínas plasmáticas. La unión a proteínas plasmáticas se debe principalmente a la fuerte reactividad del platino contra el azufre de los grupos tiol de aminoácidos como la cisteína. De hecho, aproximadamente el 90% del cisplatino en la sangre está unido a proteínas plasmáticas (principalmente albúmina), lo que lleva a la inactivación de una gran cantidad de moléculas de cisplatino. Cuando el cisplatino llega a una célula, hay varios obstáculos que superar antes de que se produzca la unión del fármaco al ADN nuclear. En algunos casos, estos mecanismos incluyen formas de detectar y determinar si el daño al ADN inducido por el cisplatino es lo suficientemente fuerte como para ser letal. En otros casos, el daño directo del cisplatino a las proteínas u otras biomoléculas puede desencadenar mecanismos de citotoxicidad (Fuertes *et al.*, 2003; Shiyao *et al.*, 2015).

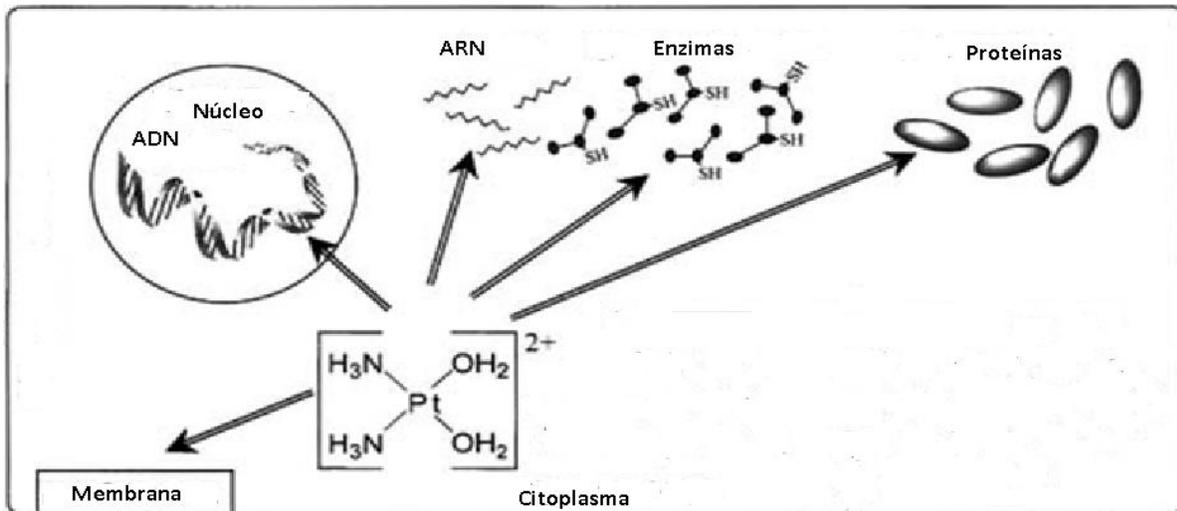


Figura 4. Representación esquemática de la reactividad del cisplatino, así como las moléculas a las que se une antes de reaccionar con el ADN (Tomado de Fuertes *et al.*, 2003; Shiyao *et al.*, 2015).

Doxorubicina

La antraciclina doxorubicina, es un metabolito de *Streptomyces peucetius*, es un agente quimioterapéutico desarrollado en la década de 70s que se usa en el tratamiento de una amplia gama de cánceres.

Hay dos mecanismos propuestos por los cuales la doxorubicina actúa en la célula cancerosa, la intercalación en el ADN así como la interrupción de la reparación del ADN mediada por topoisomerasa-II, la generación de radicales libres y su consecuente daño a las membranas celulares, el ADN y las proteínas. La doxorubicina se oxida a semiquinona, un metabolito inestable, que se convierte nuevamente en doxorubicina en un proceso que libera especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno pueden conducir a la peroxidación de lípidos y al daño de la membrana, daño del ADN, estrés oxidativo y a desencadenar vías apoptóticas de muerte celular. Alternativamente, la doxorubicina puede entrar en el núcleo y

envenenar a la topoisomerasa II, lo que también resulta en daño al ADN y muerte celular (Thron *et al.*, 2011).

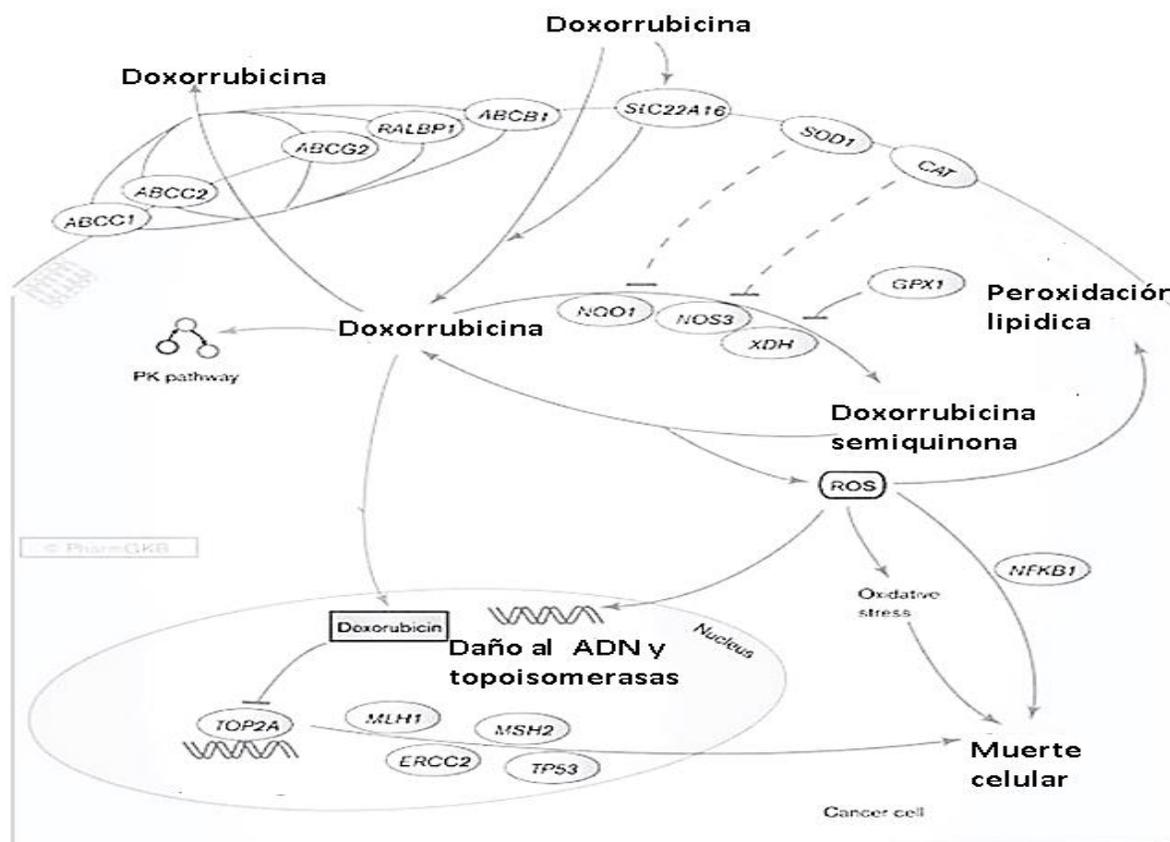


Figura 5. Mecanismos de daño propuestos para la doxorubicina. La intercalación en el ADN, lo que lleva a la inhibición de la síntesis de ADN o envenenamiento de la topoisomerasa II (TOP2A); y la generación de radicales libres, lo que lleva a daños en el ADN y la membrana celular (Tomado de Thron *et al.*, 2011).

Bleomicina

Ciertamente, la propiedad mejor caracterizada de la bleomicina es su capacidad para efectuar la degradación de los sustratos de ADN. A nivel de caracterización química de los productos, quizás los sustratos más interesantes hayan sido sustratos de oligonucleótidos de ADN de secuencia

conocida y uniforme. Estos han incluido la digestión con endonucleasas de restricción de los ADN plasmídicos, que han permitido la definición de la selectividad de secuencia de la escisión del ADN por bleomicina, así como los oligonucleótidos de ADN preparados sintéticamente cortos, el último de los cuales ha facilitado la caracterización de los productos químicos reales resultantes de la degradación del ADN por bleomicina.

La degradación del ADN mediada por bleomicina requiere la presencia de un ión metálico redox activo, como Fe^{2+} o Cu^+ , así como oxígeno molecular. Usando el octanucleótido de ADN autocomplementario $^5\text{CGCTAGCG}^3$ como sustrato, la bleomicina produce como resultado una escisión franca de la cadena de ADN (Hecht, 2000; Groseli *et al.*, 2018; Allawzi *et al.*, 2019).

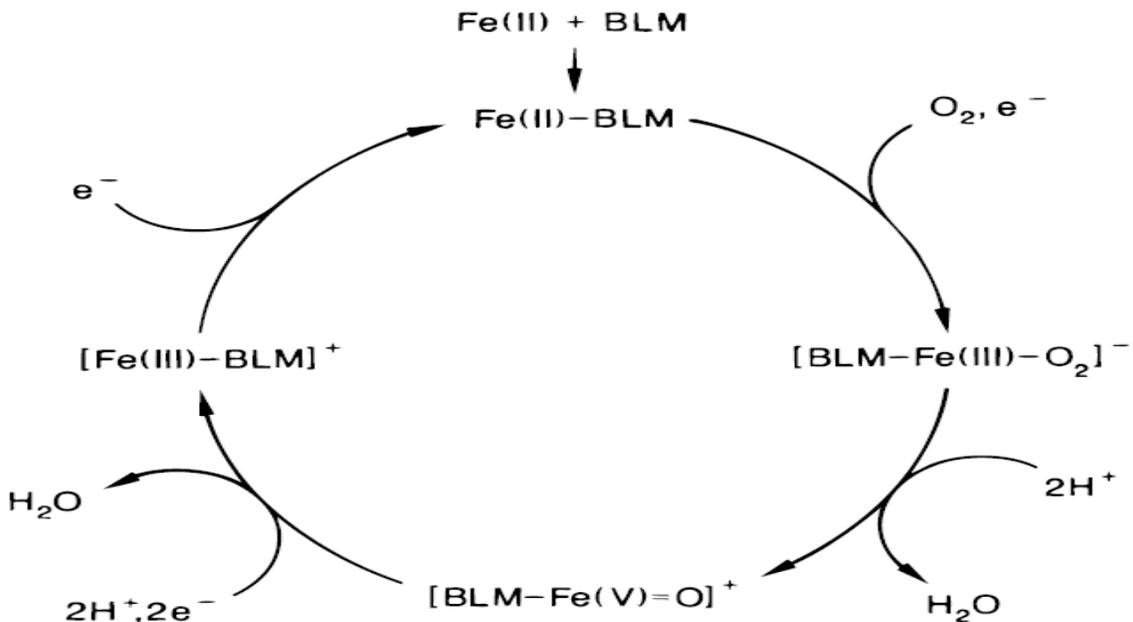


Figura 6. Posible ciclo catalítico de la bleomicina (BLM) y el hierro (Fe) como sustrato molecular para la captación de electrones (Tomado de Hecht, 2000; Allawzi *et al.*, 2019).

Es bien sabido que cuando células de mamíferos en proliferación presentan daño al ADN, estas células inician arresto del ciclo celular para reparar completamente el daño al ADN antes de

continuar con la división celular. En las células de mamíferos el gen supresor de tumores p53 juega el papel de salvaguardar la integridad del genoma humano a través de la modulación del arresto al ciclo celular, reparación del ADN y procesos apoptóticos (Whitwell *et al.*, 2015). Los datos obtenidos por el trabajo realizado por Salazar *et al.* (2009), revelan incrementos en la expresión de p53 en respuesta a tratamiento con fármacos, entre los que destaca la bleomicina, los cuales están directamente asociados con daño extremo al ADN.

***P53* y el daño al material genético**

El aumento de la exposición a xenobióticos compromete la integridad genética. Los estudios epidemiológicos de individuos expuestos a riesgos ambientales han demostrado que una alta frecuencia de daño cromosómico está asociada con el desarrollo de cáncer. Por lo tanto, es importante determinar los niveles de daño en el ADN inducidos por cientos de xenobióticos.

El gen supresor tumoral *p53* desempeña un papel clave en la protección de la integridad del genoma humano. Se han demostrado diferentes señales de estrés, incluido el ADN y el daño del huso para aumentar los niveles de *p53*. En ausencia de estrés celular, la proteína p53 de tipo salvaje se mantiene en niveles bajos por la ubiquitinación intracelular rápida, que impide su acumulación. La activación de *p53* implica un aumento en los niveles de proteína p53, así como cambios estructurales en la proteína. Las modificaciones postraduccionales generalmente resultan en la estabilización y acumulación de p53 en el núcleo, donde p53 interactúa con sitios específicos de secuencia en sus genes objetivo. Por lo tanto, la activación de p53 implica un

aumento marcado en la abundancia celular de las moléculas de p53, que luego ejecutan los eventos bioquímicos importantes en las redes de señalización reguladoras.

Estudios anteriores han propuesto que la detección de niveles elevados de proteína p53 en respuesta al tratamiento con agentes que dañan el ADN en líneas celulares podría usarse como un indicador del daño inducido por carcinógenos genotóxicos (Salazar *et al.*, 2009; Whitwell *et al.*, 2015).

Tejido epitelial bucal

Los tejidos epiteliales están en contacto inmediato con los agentes genotóxicos inhalados y son los objetivos reales de los carcinógenos (Speit *et al.*, 2007). La mucosa bucal proporciona una barrera para potenciales carcinógenos que pueden ser metabolizados para generar productos reactivos. Se sabe que el 90% de todos los cánceres parecen ser de origen epitelial, la mucosa bucal puede ser usada para monitorear eventos genotóxicos tempranos como resultado de carcinógenos potenciales que ingresan al cuerpo por ingestión o inhalación (Thomas *et al.*, 2009).

Los epitelios se nombran y clasifican según el número de capas celulares y la forma de sus células, el epitelio de la mucosa oral se clasifica como epitelio plano estratificado. Este se caracteriza por tener una lámina epitelial gruesa, donde las células que la componen varían de forma desde la base hasta la superficie. La capa cercana a la lámina basal está constituida por células cilíndricas. Por encima de esta capa basal, hay otras capas de células poliédricas. Cuanto más cerca de la superficie están, tanto más se aplanan las células para constituir verdaderos estratos. Si el epitelio plano estratificado se sitúa en una superficie externa, las células

superficiales pierden el núcleo y el citoplasma es sustituido en gran parte por una **escleroproteína**, la **queratina**. Las células son entonces estructuras desvitalizadas con forma de escama, descrito como epitelio plano estratificado queratinizado. Para el caso del tejido epitelial bucal, en las superficies internas húmedas del cuerpo, las células superficiales de este tipo de epitelio están queratinizadas y anucleadas (Fawcett, 1987).

Este epitelio escamoso estratificado consta de cuatro capas distintas. El estrato córneo o la capa de células queratinizadas, alinean la cavidad oral que comprende células que son constantemente derramadas como resultado del desgaste del tejido superficial. Debajo de esta capa, se encuentra el estrato granuloso, o la capa de células granulares, y el estrato espinoso, o la capa de células espinales, que contiene poblaciones de células diferenciadas, apoptóticas y necróticas. Debajo de estas capas se encuentra el estrato germinativo, que contiene células basales que se dividen activamente y células madre basales, que producen progenie que diferencian y mantienen el perfil, la estructura y la integridad de la membrana (**Figura 7**). Se cree que el intervalo de tiempo para la migración celular desde la capa basal a la capa superficial queratinizada oscila entre 7 y 21 días, aunque los datos experimentales que investigan tales tasas de migración son limitados (Thomas *et al.*, 2009).

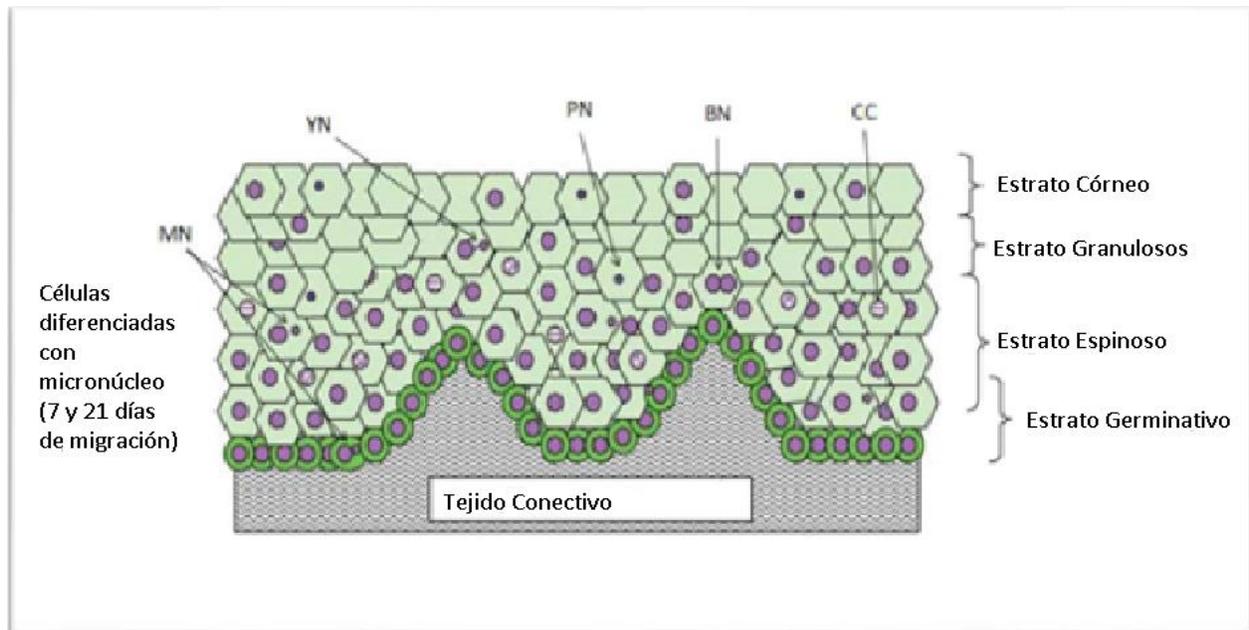


Figura 7. Representación esquemática de una sección transversal de la mucosa bucal normal. Con micronúcleo (MN), yema nuclear (YN), célula binucleada (BN), cromatina condensada (CC) célula picnótica (PN) (Modificada de Thomas *et al.* 2009).

Ensayo de Micronúcleos (MNxl)

Los micronúcleos son fragmentos o cromosomas enteros, que no alcanzaron los polos del huso durante la mitosis y permanecen encapsulados en la telofase en un núcleo separado. El ensayo de aberración cromosómica detecta sólo el daño del genoma, mientras que el ensayo de micronúcleos detecta adicionalmente la pérdida de cromosomas o el mal funcionamiento del huso mitótico causado por mecanismos aneugénicos (Kashyap *et al.*, 2012). Los micronúcleos son muy relevantes porque representan verdaderos eventos mutagénicos (es decir, una mutación cromosómica transmitida a una célula hija). El ensayo de micronúcleos de células orales exfoliadas representa un ensayo mínimamente invasivo y de fácil obtención, que se ha ido perfeccionando y estandarizando desde principios del siglo pasado. Además, se ha sugerido su

uso como un marcador temprano de eventos de daño genético nuclear que podrían dar lugar a eventos cancerígenos (Holland *et al.*, 2008)

Los micronúcleos en células exfoliadas emergen durante la mitosis de las capas basales del epitelio como partículas extracromosómicas de ADN y no se incluyen en los núcleos principales de las células hijas. Por lo tanto, la formación de micronúcleos es inducida por sustancias que causan la rotura de cromosomas (clastógenos) así como por agentes que afectan al aparato del huso mitótico (aneugénicos). “*Esto implica que no hay diferencias significativas en las frecuencias MN entre individuos que han estado expuestos a clastógenos por un período de muchos años y otros que sólo fueron expuestos durante un corto tiempo*” (Majer *et al.*, 2001), siempre y cuando las poblaciones de células madre o indiferenciadas no estén dañadas a nivel del genoma.

Criterios para la clasificación de las células exfoliadas de la mucosa oral

Para determinar los tipos de células exfoliadas de la mucosa oral obtenidas y basándose en las características morfológicas de las células teñidas con Feulgen/Light Green se tomaron los criterios propuestos por Thomas *et al.* (2009), y Bolognesi *et al.* (2013).

Célula normal basal: Tienen una relación núcleo-citoplasma mayor que las células bucales diferenciadas (Figura 8a). Las células basales tienen un núcleo uniformemente teñido y son de menor tamaño y de forma más ovalada en comparación con las células bucales diferenciadas más angulares y planas. **Célula diferenciada:** núcleo más pequeño, angular y más plano que las células basales,

redondas y uniformemente teñidas (Figura 8b). **Micronúcleo:** Contiene tanto el núcleo principal como el micronúcleo, los micronúcleos son redondos u ovales con una intensidad de tinción similar al del núcleo principal, los micronúcleos suelen tener $1/3$ - $1/16$ de diámetro del núcleo principal, los micronúcleos deben estar localizados en el citoplasma celular (Figura 8c, d). **Brote nuclear:** El núcleo principal tiene una constricción aguda que forma un brote, este se ata al núcleo principal, tiene intensidad de la tinción similar como núcleo principal, el diámetro del brote puede ser cuarto a medio diámetro nuclear (Figura 8e).

Células binucleadas: este tipo de célula contiene dos núcleos principales, los núcleos son de tamaño e intensidad de tinción es similar (Figura 8f). **Cromatina condensada:** muestra áreas de cromatina agregada, distintas áreas de núcleo están más intensamente teñidas, el núcleo exhibe patrón estriado (Figura 8g). **Célula Cariorréxica:** El núcleo tiene cromatina agregada extensa, la fragmentación nuclear puede ser evidente (Figura 8h). **Célula Picnótica:** tiene un núcleo encogido, que está uniforme e intensamente teñido, el diámetro del núcleo es $1/3$ - $2/3$ diámetro del núcleo normal (Figura 8i). **Célula Cariolítica:** El núcleo está agotado de ADN, no está teñido por Feulgen (Figura 8j).

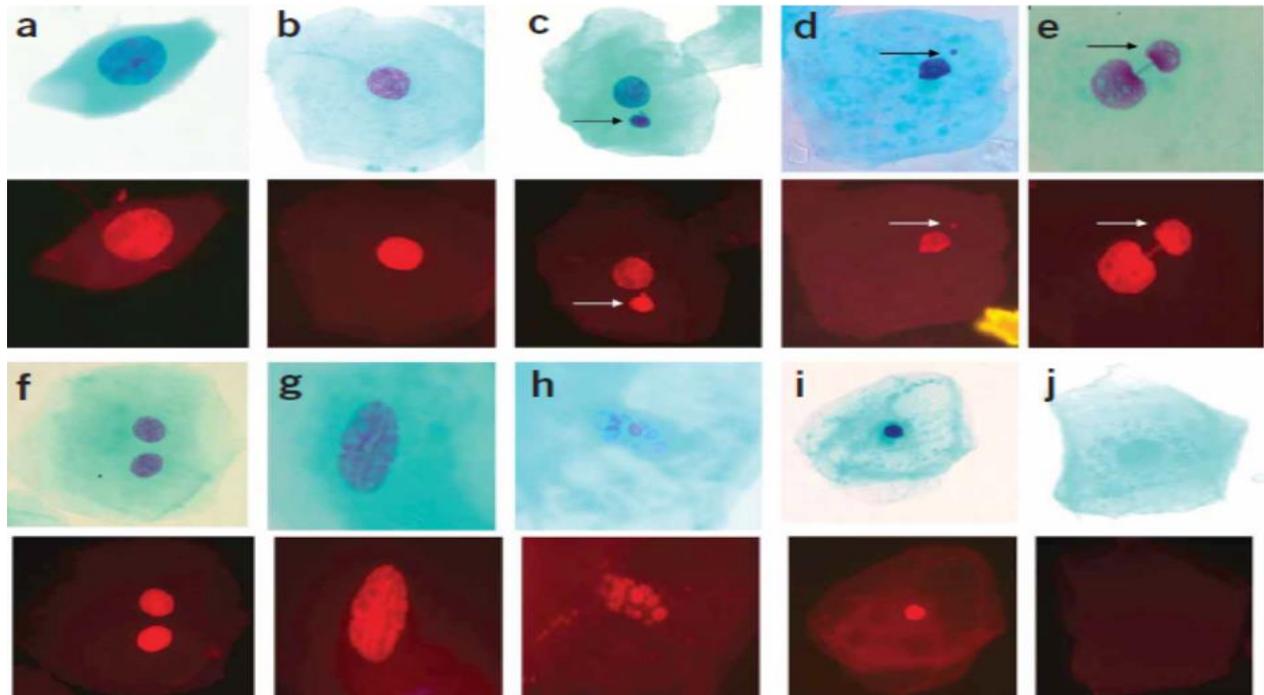


Figura 8. Diferentes tipos de daño celular usando tinción Feulgen/Light-Green; ver texto (Tomada de Thomas *et al.*, 2009).

Antecedentes

La literatura acerca de los cambios nucleares (genómicos) en personal de enfermería que maneja agentes antineoplásicos difiere en los resultados arrojados usando varias pruebas, Cavallo *et al.* (2005), incluyendo en su estudio a agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos y hormonas, encuentra que no hay diferencia significativa entre los grupos control y expuesto de enfermeras italianas usando la técnica de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (MNCB), en contraste con la técnica de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral (MNxl).

Otros autores encuentran una asociación directa entre la exposición a antineoplásicos y daño al material genético nuclear, Bouraouia *et al.* (2011) encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de enfermeras Tunesianas, así como de aberraciones

cromosómicas en un grupo conformado por 20 trabajadores expuestos a antineoplásicos en comparación con el grupo control.

En cuanto al daño en el material genético nuclear de enfermeras mexicanas, el estudio realizado por Alcántar Zavala (2015) se encontró una relación positiva entre exposición a citostáticos (ciclofosfamida, ifosfamida, metrotexato, cisplatino, doxorubicina y bleomicina) y daño genotóxico por la presencia de yemas nucleares en células exfoliadas de la mucosa oral (2.65 ± 2.72 VS 16.81 ± 25.79 [X±SD]). Además, se encontró que, a menor autocuidado en la preparación y manejo de citostáticos, se presenta mayor genotoxicidad en el personal de enfermería. Por lo que, en el presente estudio, se propuso dar seguimiento al trabajo a 1, 2 y 3 años de la primera evaluación realizada en el año 2015 por la Dra. Alcántar, para establecer si persiste el daño al material genético nuclear.

Justificación

La exposición a ciertos químicos como los quimioterapéuticos pueden generar daño al material genético. Por lo que, con motivo de una exposición ocupacional a quimioterapéuticos, esta investigación aplica el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal, con el fin de evaluar los riesgos a la exposición de fármacos antineoplásicos para establecer una gestión adecuada de los trabajadores que manipulan y preparan estos fármacos.

Hipótesis

En una evaluación inicial del personal de enfermería expuesto ocupacionalmente a antineoplásicos se encontró una relación positiva entre exposición a citostáticos y daño genotóxico evidenciado por la presencia de yemas nucleares en células exfoliadas de la mucosa oral. Por tanto, las enfermeras que sigan expuestas de forma ocupacional a quimioterapéuticos presentaran daño persistente en el material genético a 1, 2 y 3 años de la primera evaluación.

Objetivos

General:

Establecer la relación entre la exposición laboral a quimioterapéuticos y daño genotóxico, citotóxico y citostático a 1, 2 y 3 años de la primera evaluación, en células exfoliadas de la mucosa oral en enfermeras.

Particulares:

- Biomonitorrear el daño al ADN mediante la cuantificación de micronúcleos y yemas nucleares.
- Verificar el efecto citotóxico de los agentes quimioterapéuticos mediante la evaluación de tipos celulares asociadas a muerte.
- Evaluar y cuantificar células binucleadas para establecer defectos en la citocinesis.
- Establecer la persistencia de daño inducido por quimioterapéuticos al material genético nuclear.

Método

Se le dio seguimiento por 3 años a 12 enfermeras con exposición a quimioterapéuticos (ciclofosfamida, ifosfamida, metrotexato, cisplatino, doxorubicina y bleomicina) las cuales fueron reclutadas de cinco instituciones del sector salud público de Morelia, Michoacán, comprendidas entre 21 y 60 años al momento de la toma de muestras. El criterio de selección fue que hayan dado su consentimiento y que hayan tenido una exposición a quimioterapéuticos, mientras que se excluyó a las enfermeras que no desearan participar en el estudio, que no hayan tenido exposición ocupacional a quimioterapéuticos o en tratamiento directo con antineoplásicos o radioterapia. Se tomó un grupo de enfermeras no expuestas como control negativo de las mismas instituciones del sector salud. Se les pidió su consentimiento informado y que contestaran un cuestionario.

Toma de muestras: Se instruyó a las enfermeras a cepillarse y enjuagar su boca teniendo preferencia por los carrillos. Se realizó un raspado de la mucosa oral izquierda de arriba hacia abajo 3 o 6 veces con el citobrush. Inmediatamente después se realizó el frotis con el citobrush sobre el portaobjetos (previamente desengrasado y rotulado). Posteriormente, se fijó con spray citológico (Citocell, México). Se repitió el procedimiento para el carrillo derecho. Por último, se realizó un tercer frotis, ahora de ambos carrillos, repitiendo el procedimiento.

Se utilizó la técnica de micronúcleos orales con la tinción Light Green-Schiff: Donde se colocaron las laminillas en una coplin con etanol (Meyer, México) 50% y al 20% (V/V), esto para deshidratar la célula. Posteriormente, se colocaron por 30 minutos en una coplin con HCl (Meyer, México) 5M, para separar las purinas de la desoxirribosa, provocando se abrieran los anillos de monosacáridos. Se colocaron las laminillas en una coplin perfectamente tapada y cubierta con reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich, USA) durante 60 minutos, para que una vez

escindidas las bases se formen grupos aldehídos con los cuales el reactivo de Schiff produce su coloración magenta. Después se pasó a una coplin con Light Green (Sigma-Aldrich, USA) durante 10 minutos, para teñir el citoplasma de verde. Por último, se enjuagó en agua destilada y se dejó secar para observar en el microscopio de campo claro a 20, 40 y 100 aumentos (Nikon, Japón).

Evaluaciones Citogenéticas

Se contabilizaron 1000 células por individuo muestreado estableciendo los diferentes tipos celulares (cariorréxicas, con cromatina condensada, picnóticas y cariolíticas) asociadas a diferentes tipos de citotoxicidad (apoptosis y/o necrosis), de células binucleadas asociadas a citostaticidad, además, se contabilizaron otras 1000 células estableciendo genotoxicidad, donde se registró la frecuencia de micronúcleos (MNxl) y yemas nucleares (YNxl).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se desarrolló usando la “*t*” de Student para comparar los datos de la **media (X)** y **desviación estándar (DE)** de cada uno de los tipos de daño de los grupos control y expuesto de los años 2016, 2017 y 2018.

Resultados

Genotoxicidad

Los datos presentados en la tabla 2 y la figura 9, muestran los datos resultantes de marcadores de daño al material genético nuclear observados en los años 2016, 2017 y 2018. Los datos al ser analizados estadísticamente muestran que para las yemas nucleares existe un aumento significativo ($p < 0.05$) del grupo expuesto en comparación con el control para los años 2016, 2017 y 2018 en los que se efectuó el seguimiento.

Tabla 2. Promedio y porcentaje de micronúcleos y yemas nucleares en enfermeras expuestas a antineoplásicos, estudio longitudinal

Grupos	N (individuos)/ No de Células	Micronúcleos		Yemas Nucleares	
		($\bar{X} \pm DS$)	(%)	($\bar{X} \pm DS$)	(%)
Control (2015)	15/ 5000	2.4 \pm 1.5	(0.2)	0.8 \pm 0.8	(0.08)
Expuesto (2015) (1ª Evaluación)	12/ 12000	5.0\pm4.9*	(0.4)*	19.5\pm12.9*	(1.7)*
Expuesto (2016)	11/3300	2.7 \pm 2.5	(0.2)	4.5\pm2.6*	(0.5)*
Expuesto (2017)	11/ 11000	2.0 \pm 2.1	(0.2)	2.8\pm1.4*	(0.2)*
Expuesto (2018)	12/ 12000	2.5 \pm 1.5	(0.2)	12.6\pm6.7*	(1.2)*

* $p < 0.05$ (“t” Student)

Micronúcleos y Yemas Nucleares de enfermeras expuestas a antineoplásicos estudio longitudinal

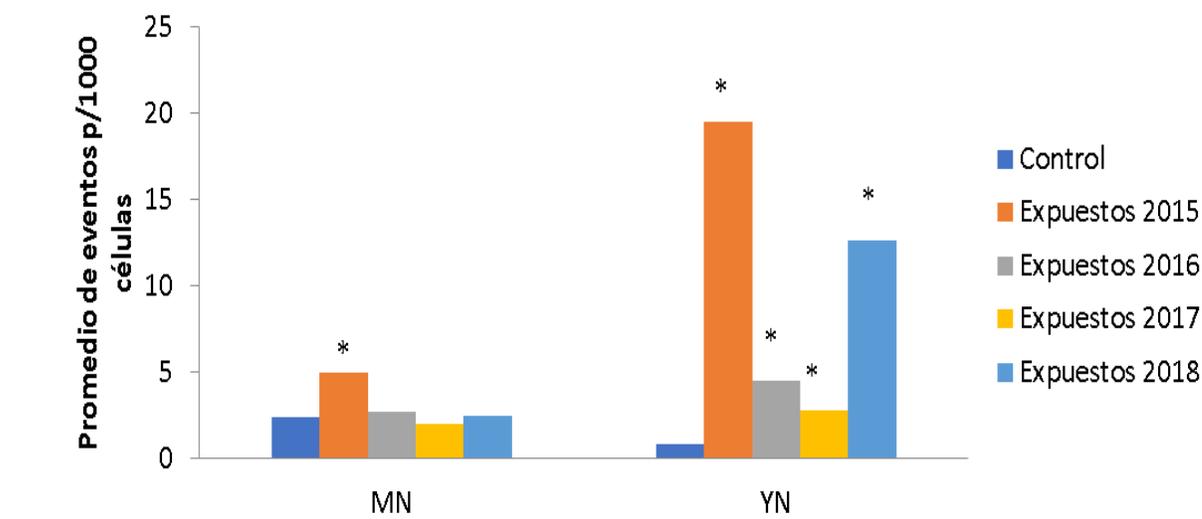


Figura 9. Micronúcleo (MN), Yema Nuclear (YN), p/cada 1000. “t” de Student *($P < 0.05$)^a Primera evaluación realizada en el 2015.

Citotoxicidad y Citostaticidad

Para el marcador de daño citotóxico evidenciado por las células picnóticas y cariolíticas el incremento del grupo expuesto en comparación con el control es estadísticamente significativo ($p < 0.05$), en las mediciones realizadas en los años 2016, 2017 y 2018 (Figura 10 y 11). Sin embargo, para el marcador de muerte celular por apoptosis, las células cariorréticas y con cromatina condensada al ser evaluadas forma conjunta, el resultado no marca diferencia significativa entre el grupo expuesto y control. Por último, para las células binucleadas el incremento en el grupo expuesto es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con el control (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio y porcentaje de células asociadas de Citotoxicidad y Citostaticidad de enfermeras expuestas a antineoplásicos estudio longitudinal

Grupos	N (Individuos)/ No de Células	Citostaticidad		Citotoxicidad					
		Células Binucleadas (X±DS) (%)		Cromatina Condensada/ Cariorrhexica (X±DS) (%)		Células Picnóticas (X±DS) (%)		Cariolíticas (X±DS) (%)	
Control (2015)	15/5000	4.4±2.6	(0.4)	2.1±2	(0.2)	4.8±1.6	(0.4)	16±4.3	(1.6)
Expuesto (2015) 1ª Evaluación	12/3300	7.09±7.02*	(0.6)*	58.5±27.1*	(10.7)*	42.09±23.1*	(3.8)*	144.8±57.1*	(13.2)*
Expuesto (2016)	11/11000	14.0±9*	(1.6)*	4.2±2.7	(0.5)	18.5±15*	(2.2)*	43.2±7.8*	(5.2)*
Expuesto (2017)	11/11000	17.18±10.7*	(1.7)*	2.9±2	(0.2)	4.5±4.4	(0.4)	37.3±25.3*	(3.7)*
Expuesto (2018)	12/12000	24.8±18.8*	(2.4)*	1.1±1	(0.1)	41.0±34.2*	(4.1)*	87.5±67.8*	(8.8)*

(X±SD) “t” Student, * (p<0.05)

Células asociadas a Citostaticidad y Citotoxicidad de enfermeras expuestas a antineoplásicos estudio longitudinal

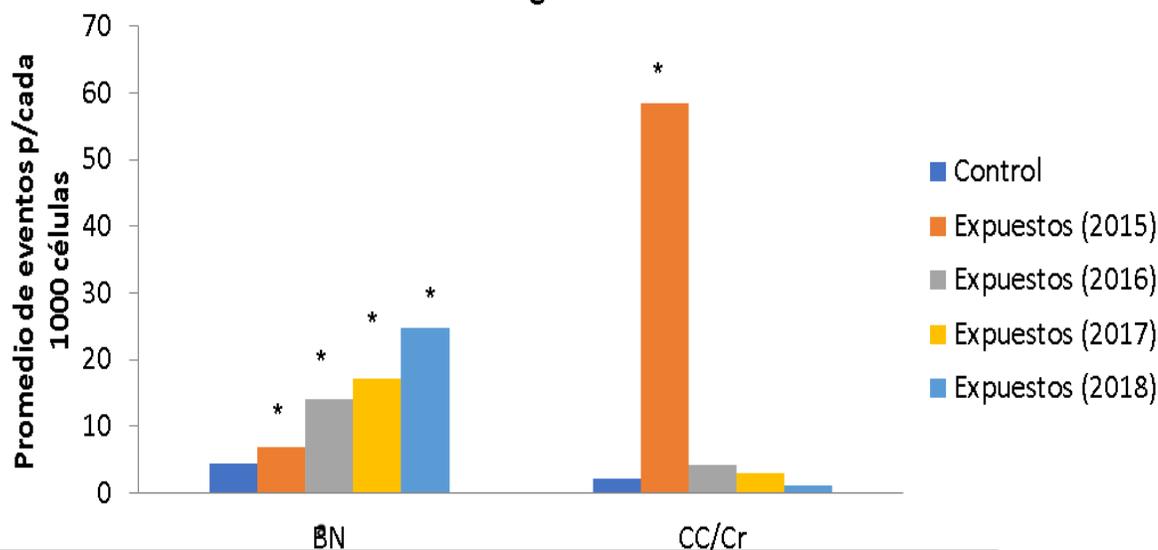


Figura 10. Célula binucleada (BN), cromatina condensada (CC), Carirréctica (Cr), p/cada 1000. “t” de Student *(p<0.05) Primera evaluación 2015

Células asociadas a daño Citotóxico de enfermeras expuestas a antineoplásicos estudio longitudinal

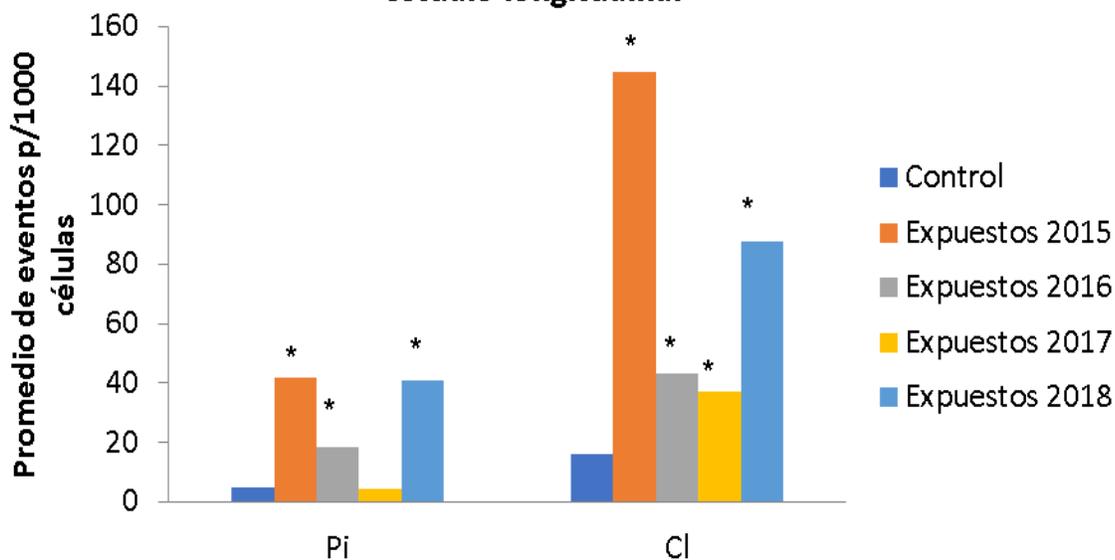


Figura 11. Célula Picnótica (Pi) y Carilítica (Cl). p/cada 1000. “t” de Student *(P<0.05)*Primera evaluación realizada en el 2015

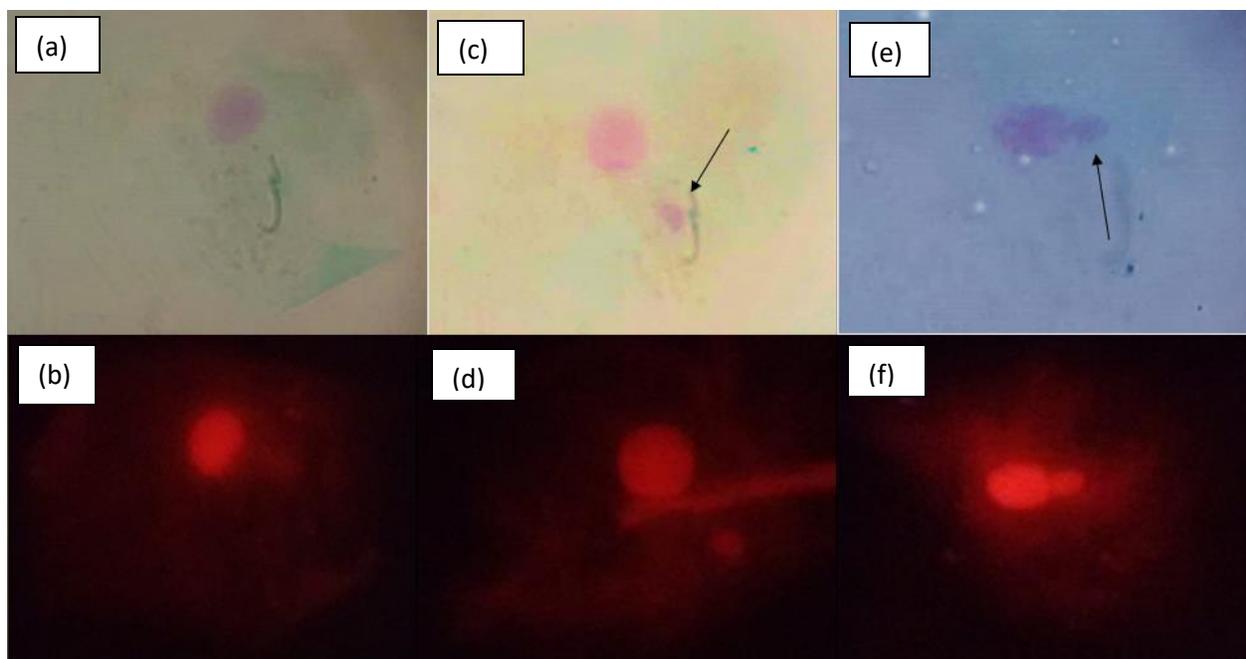


Figura 12. Microfotografías de células exfoliadas en campo claro y fluorescencia, célula diferenciada (a -b), micronúcleo (c-d), y yema nuclear (e-f), (100x) (García y Roldán, 2019, Laboratorio Citogenética y Mutagénesis, UMIEZ FES Zaragoza).

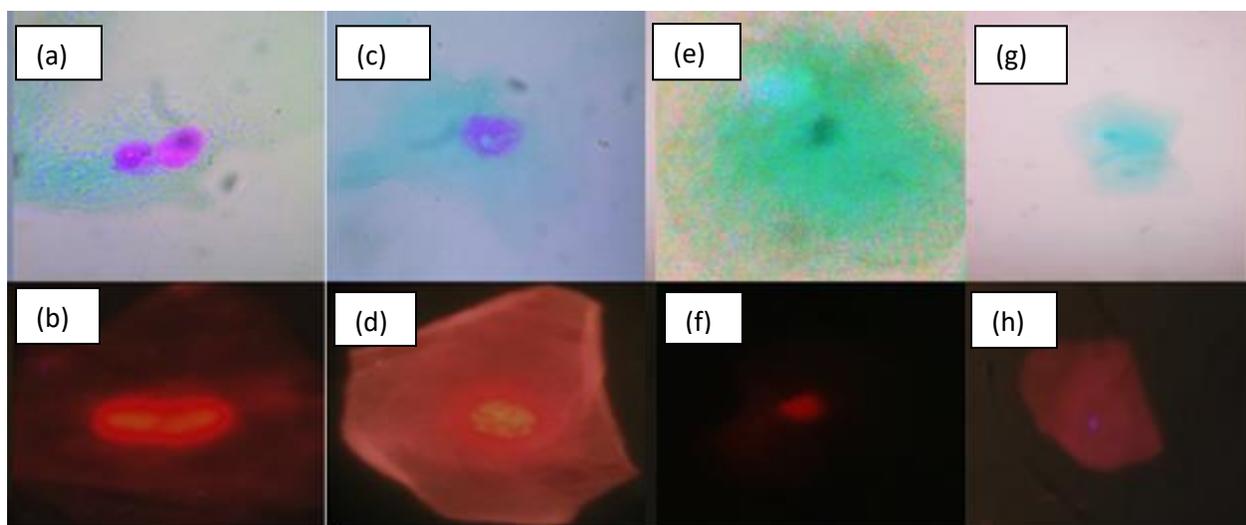


Figura 13. Microfotografías de células exfoliadas en campo claro y fluorescencia, célula binucleada (a-b) con cromatina condensada/cariorrética (c-d), picnótica (e-f) y cariolítica (g-h), (100x) (García y Roldán, 2019, Laboratorio Citogenética y Mutagénesis, UMIEZ FES Zaragoza).

Discusión

Genotoxicidad

Para esta investigación el incremento significativo de **yemas nucleares** en comparación con el grupo control revela daño al material genético nuclear, debido a que estas anomalías se forman de la eliminación ADN amplificado durante la interfase o mecanismos de reparación del ADN (Thomas *et al.*, 2009; Fenech y Crott, 2002).

El mecanismo de distinción de cadena utilizado por el sistema de reparación de desajustes dirigido por hebras depende de la metilación de residuos de citosina seleccionados en el ADN. Los grupos metilo se agregan a todos los residuos de citosina en la secuencia GATC, pero no hasta algún tiempo después que se haya incorporado en una cadena de ADN recién sintetizada. Como resultado, las únicas secuencias que aún no se han metilado están en la nueva hebra justo detrás de una bifurcación de replicación. El reconocimiento de estos GATC no metilados permite que las nuevas cadenas de ADN se distingan transitoriamente de las antiguas (Alberts *et al.*, 2008). Por lo que, al ocurrir la hipometilación por ausencia de folato en el ADN, se engaña al sistema de síntesis del ADN, para que se genere ADN redundante producto del no reconocimiento de citocina metilada en la nueva hebra.

Se tiene evidenciado que la formación de yemas nucleares se ve inducido por la deficiencia de ácido fólico en linfocitos de sangre humana, debido a que adecuados niveles de folato, previene la hipometilación (Fenech y Crott, 2002). Y dado que el ácido fólico es una vitamina, considerado nutriente esencial, con estrecha interacción metabólica en la síntesis de nucleótidos (Píta Rodríguez, 1998; Cortez *et al.*, 2000), podemos extrapolar que forma indirecta, la formación de yemas nucleares se debe al metotrexato, debido a que inhibe competitivamente la dihidrofolato-reductasa (enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, el

cofactor necesario para la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas) (Witt y Bishop, 1996).

En nuestro grupo de estudio, las enfermeras expuestas a quimioterapéuticos presentaron un número constante de **micronúcleos** que no representa un aumento significativo entre el grupo expuesto y el control, lo que posiblemente puede significar que las células con inestabilidad genética, los micronúcleos, pueden seguir uno de varios posibles caminos, degradación, reincorporación, extrusión, persistencia, condensación prematura de los cromosomas/cromotripsis (Hintzsche *et al.*, 2017). Dado que el promedio en general de los micronúcleos presentes en células exfoliadas de la mucosa oral se mantiene relativamente constante a través del tiempo, podría ser el caso de que las células con alteraciones, las células micronucleadas, no fueron degradados, reincorporados o extruidos más bien de que la mayoría de las células micronucleadas son arrestadas en su ciclo celular por la transcripción del gen p53, activado en respuesta directa al extenso daño al material genético (Salazar *et al.*, 2009), persistiendo de forma constante a través de los años en los que se realizaron las mediciones.

Citotoxicidad

Y en cuanto a la frecuencia mayor de células **picnóticas**, nos revela que las células entraron al proceso de muerte celular (Tolbert *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 2009). Se tiene reportado que las células picnóticas son evidencia del proceso de apoptosis, por lo que este marcador nos puede servir como marcador de vigilancia, ya que pueden evidenciar que el principal efecto de los antineoplásicos se está llevando a cabo, mediante muerte celular programada o apoptosis.

Podemos atribuirle este evento a los efectos que tiene los antineoplásicos que se unen al material genético nuclear generando aductos, este es el caso de la Ciclofosfamida e Ifosfamida que reaccionan con átomos de los ácidos nucleicos, formando puentes intracatenarios en la doble hélice de ADN, provocando interferencias importantes en los procesos de transcripción y replicación del ADN (Witt y Bishop, 1996), con esto cesa la síntesis de ADN y la célula muere.

Además, también se le puede atribuir al Cisplatino el elevado número de células picnóticas debido a que, para este compuesto se estima solo el 1% de las moléculas de cisplatino se unen al ADN formando enlaces cruzados e interviniendo en la síntesis de ADN, esta molécula también inhibe a la proteína de choque térmico Hsp90, la cual está involucrada en la transducción de señales, regulación del ciclo celular y reparación de enlaces cruzados entre cadenas (Fuertes *et al.*, 2003). De esta forma, al provocar aductos con la proteína Hsp90 se genera una célula incapaz de corregir sus errores de replicación en el material genético nuclear.

Se encontró evidencia de que en muchas células sufrieron muerte celular por necrosis asociado a **células cariolíticas** (Tolbert *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 2009), al encontrar un elevado número de estas células en el grupo expuesto en los tres años en los que se realizó la medición. Dentro de los antineoplásicos a los que están expuestas las enfermeras se encuentra la Bleomicina, al cual podemos atribuirle este evento, debido a que este químico produce rompimientos dobles de la cadena de ADN, por la producción de complejos radicales libres usando iones de oxígeno. Por lo que la escisión directa del ADN puede ser el resultado de este complejo (Witt y Bishop, 1996).

En el trabajo realizado por Hecht, (2000) se demuestra que la bleomicina está caracterizada por degradar substratos de ADN con la presencia de un ion metálico como el Fe 2+, así como oxígeno molecular a través de la extracción de átomos de Hidrogeno. Este proceso se lleva a cabo

por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales se caracterizan por ser átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre de sus orbitales externos, de esta manera al sustraer electrones de moléculas estables crean más radicales libres generando una reacción en cadena que destruye a las células (Roldán, 2016). Por lo que, posiblemente el agotamiento de los sustratos y la digestión de la doble hebra de ADN sea consecuencia de la interacción de la bleomicina con estos sustratos.

También se sabe que el Cisplatino inhibe la actividad del sistema de reparación de rompimientos de la doble hebra de ADN, a través de la inhibición de las subunidades de la proteína DNA-PK, la cual se encarga de la reparación de los rompimientos de doble hebra del ADN inducidos por radiación ionizante (Fuertes *et al.*, 2003). De esta manera, la acción simultanea de la bleomicina y el cisplatino, genera la digestión de los sustratos del ADN, así como la incapacidad de corregir esta escisión de los nucleótidos.

Citostaticidad

Podemos ver también que las **células binucleadas** tienen valores elevados del grupo expuesto en comparación con el control, podemos atribuirle este evento a la Doxorubicina, debido a que interrumpe la red de filamentos de actina por la inhibición de la polimerización de esta molécula (Fraczkowska *et al.*, 2018). De esta forma generan células incapaces de terminar la división celular bloqueando la citocinesis.

En cuanto a la persistencia del daño al material genético nuclear, los datos muestran un aumento en los marcadores de daño genotóxico, citotóxico y citostático evidenciado por yemas nucleares, células binucleadas, picnóticas y cariolíticas en todos los años en los que realizaron las mediciones, lo que podría indicar persistencia, posiblemente debido que de las células troncales que poseen toda la maquinaria para la producción de múltiples generaciones de células (Zamorano-Ponce *et al.*, 2008) han sido dañadas. Esto es especialmente válido para sistemas en renovación permanente, como el epitelio bucal, en el que las células troncales son las únicas que persisten un tiempo suficiente en el tejido como para acumular mutaciones (Humphries y Wright., 2008), generando linajes de células (clonas), con persistencia daño.

Las investigaciones sobre el riesgo de generar daño genotóxico por la exposición a agentes antineoplásicos usando distintos métodos, concuerdan con nuestros hallazgos de que existe daño genotóxico significativamente mayor en el personal expuesto que maneja, prepara y/o administra los agentes antineoplásicos en comparación con el control. Fuchs *et al.* (1995), Fucic *et al.* (1998) y Bouraoui *et al.* (2011) reportan encontrar un aumento significativo de micronúcleos en enfermeras que manipulan agentes antineoplásicos comparado con los controles, usando linfocitos de sangre periférica. Burgaz *et al.* (1999) y Cavallo *et al.* (2007), usando la técnica de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral reportan un aumento significativo del marcador asociado a daño genotóxico, micronúcleos, en el personal de enfermería expuesto a antineoplásicos comparado con los controles. Estos hallazgos además concuerdan con los reportados por Alcántar-Zavala (2015), donde reporta que a menor autocuidado en el manejo de antineoplásicos aumentan las células asociadas a daño genotóxico. Sin embargo, a pesar de encontrar en el presente estudio un aumento significativo de yemas nucleares asociadas a daño

genotóxico, discrepa con los datos reportados por Burgaz *et al.* (1999) y Cavallo *et al.* (2007) sobre la frecuencia de micronúcleos de forma específica, esto puede deberse debido a la naturaleza del mecanismo de acción de los antineoplásicos a los que las enfermeras en los estudios realizados estaban expuestas. Además, la sensibilidad del ensayo de micronúcleos de la mucosa oral puede detectar rompimientos de la doble hebra del ADN que fueron excluidos del núcleo, sin embargo, no puede detectar si estos rompimientos originan rearrreglos cromosómicos o de una sola cromátida, como por ejemplo las translocaciones de uno o más cromosomas, configuraciones cuadrirradiales o cromosomas isodicentricos. Por lo que para tener resultados que revelen todos los efectos que pueda tener la exposición a agentes antineoplásicos es necesario incluir junto con el ensayo de micronúcleos exfoliados de la mucosa oral, algún ensayo de bandeo de cromosomas como el bandeo G de linfocitos de sangre periférica.

Conclusiones

La presente investigación, usando el método de células exfoliadas de mucosa oral encuentra que existe riesgo de daño al material genético nuclear como consecuencia de la exposición a la Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metrotexato, Cisplatino, Doxorubicina y Bleomicina.

- El elevado número de **yemas nucleares** encontradas en comparación con el grupo control evidencia de **daño genotóxico** debido a la acción del **antineoplásico metotrexato**.
- Con base en nuestros datos se encontró evidencia de **daño citotóxico** a través del proceso de la **apoptosis**, por un elevado número de **células picnóticas** en el grupo expuesto.
- Así como daño **citotóxico** por **necrosis** debido al incremento significativo de **células cariolticas** en el grupo expuesto por la acción digestiva del ADN por la **bleomicina**.

- Por lo anterior, las enfermeras que estén expuestas ocupacionalmente a antineoplásicos presentarán daño citotóxico por **apoptosis** y **necrosis**.
- Se evidenció **daño citostático** por el incremento significativo de **células binucleadas** en el grupo expuesto debido a la acción que ejerce la doxorubicina sobre las fibras actina.
- Por lo que, con base en nuestros resultados, la exposición laboral a los antineoplásicos mencionados genera daño **genotóxico, citotóxico y citostático**.
- Existe persistencia de daño causado por los agentes antineoplásicos en las evaluaciones realizadas en los años 2016, 2017 y 2018.

Referencias Bibliográficas

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) Molecular Biology of the Cell. Garland Science. USA p. 233.
- Alcántar-Zavala M. A. (2015) Autocuidado en la preparación y manejo de Citostáticos y su relación con Genotoxicidad en el personal de enfermería. Tesis Doctoral. Universidad de Guanajuato.
- Allawzi A., Elajaili H., Redente E. F., Nozik-Grayck E. (2019) Oxidative toxicology of bleomycin: Role of the extracellular redox environment. Current Opinion on Toxicology, 13: 68-73.
- Bouraoui S., Brahem A., Tabka F., Mrizek N., Saad A., Elghezal H. (2011) Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. Environmental Toxicology and Pharmacology, 31: 250-257.
- Bolognesi C., Knasmueller S., Nersesyan A., Fenech P. T. M. (2013) The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. Mutation Research/ Reviews in Mutation Research, 753: 100-113.
- Brown P. M., Pratt A. G. Isaacs J. D. (2016) Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. Nature Reviews Rheumatology, 12: 731-742.
- Burgaz S., Karahalil B., Bayrak P., Taskin L., Yavuzaslan F., Bokesoy I., Anzion R., Bos R., Platin N. (1999) Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. Mutation Research, 439: 97–104.

- Cavallo D., Ursini C., Omodeo-Sal E., Iavicoli S. (2007) Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 628: 11–18.
- Cavallo D., Ursini C., Perniconi B., Di Francesco A., Giglio M., Rubino F., Marinaccio A., Iavicoli S. (2005) Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutation Research* 587: 45-51.
- Cornetta T., Padua L., Testa A., Ievoli E., Festa F., Tranfo G., Baccelliere L., Cozzi R. (2008) Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 638: 75-82.
- Cortez M. F., Hirsch B. S., Pia de la Masa C. M. (2000) Importancia del ácido fólico en la medicina actual. *Revista médica de Chile*, 128: 1-6
- Cvitkovic E., Droz J., Armand J. Khoury S. (1993) Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Scientific Communication International Ltd, 2: 242-243.
- Fawcett W. D. (1987) Tratado de Histología. Interamericana Mc Graw-Hill. p. 58-60.
- Fenech M., Crott J. W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, 504: 131-36
- Fleming R. A. (1997) An Overview of Cyclophosphamide and Ifosfamide Pharmacology. *Pharmacotherapy Supplement*, 17: 5
- Fraczkowska K. , Bacia M., Przybyło M., Drabik D., Kaczorowska A., Rybka J., Stefanko E., Drobczynski S., Masajada J., Podbielska H., Wrobel T., Kopaczynska M. (2018) Alterations of biomechanics in cancer and normal cells induced by doxorubicin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97: 1195-1203.
- Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Perez J.M. (2003) Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Current Medical Chemistry*, 10: 257-266.
- Fuchs J., Hengstler J., Jung D., Hiltl G., Konietzco J., Oesch F. (1995) DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. *Mutation Research*, 342: 17-23.
- Fucic A., Jazbec A., Mijic A., Seso-Simic D., Tomek R. (1998) Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 416: 59-66.
- Groseli A., Kranjc S., Bosnjak M., Krzan M., Kosjek T., Prevc A., Cemazar M., Sersa G. (2018) Vascularization of the tumors affects the pharmacokinetics of bleomycin and the effectiveness of electrochemotherapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 123: 247-256.
- Hecht S.M. (2000) Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *Journal of Natural Products*, 63: 158-168.
- Helsby N. A., Yong M., Van Kan M., Zoysa J. R. Burns K. E. (2019) The importance of both CYP2C19 and CYP2B6 germline variations in cyclophosphamide pharmacokinetics and clinical outcomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85: 1925-1934.
- Hintzche H., Hemmann U., Poth A., Utesch D., Lott J., Stopper H. (2017) Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771: 85-98.
- Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders C., Bonassi S., Zeiger S., Siegfried K., 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. *Mutation Research*, 659: 93-108.
- Humphries A., Wright N. A. (2008) Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8: 415-424.
 - Kashyap B, Padala S. (2012) Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *Cancer Journal*, 8: 184-191.
 - Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Kasuba V., Rozgaj R., Ramic S., Vesna-Pavlica, Zeljezic D. (2009) Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: A multi-biomarker approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 212: 414-431
 - Machado-Santelli G. M., Marcilio Cerqueira E., Tosello Oliveira C., De Braganca Pereira. (1994) Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 322: 203-208.
 - Majer B., Laky B., Knasmuller S., Kassi F. (2001) Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, 489: 147-172.
 - Olsen E. A. (1991) The pharmacology of methotrexate. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25: 306-18
 - Píta Rodríguez G. (1998) Ácido Fólico y vitamina B₁₂ en la nutrición humana. *Revista Cubana de alimentación y nutrición*, 12: 107-119.
 - Roldán R. E. (2016) Introducción a la Toxicología. UNAM. FES Zaragoza. México. p. 63-67.
 - Roussel C., Witt K. L., Shaw P. B., Connor T. H. (2017) Meta-analysis of chromosomal aberrations as a biomarker of exposure in healthcare workers occupationally exposed to antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 781: 207-217.
 - Salazar A. M., Sordo M., Ostrosky-Wegman P. (2009) Relationship between micronuclei formation and *p53* induction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672: 124-128.
 - Santelli G., Cerqueira E., Oliveira C., Pereira C. (1994) Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 322: 203-208.
 - Shiyao Z., Navjotsingh P., Chengyuan T., Liyu H., Zheng D. (2015) DNA Damage Response in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Archives of Toxicology*, 89:2197-2205.
 - Speit G., Schmid O., Frohler-Keller M., Lang I., Triebig G. (2007) Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. *Mutation Research*, 627: 129-135.
 - Sorsa M., Anderson D. (1996) Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutation Research*, 355: 253-261.
 - Thomas P., Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmueller S., Fenech M. (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4: 825-837.
 - Thorn C. F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T. E., Altman R. B. (2011) Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*. 7: 440-446.
 - Tolbert E., Shy C., Allen W. (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, 271: 69-77.

- Ursini C. L., Omodeo Salé E., Fresegna A. M., Ciervo A., Jemos C., Maiello R., Buresti G., Colosio C., Rubino F. M., Mandić-Rajčević S., Chiarella P., Carbonari D., Delrio P., Maiolino P., Marchetti P., Boccia R., Iavicoli S., Cavallo D. (2019) Antineoplastic drug occupational exposure: a new integrated approach to evaluate exposure and early genotoxic and cytotoxic effects by no-invasive Buccal Micronucleus Cytome Assay. *Toxicology Letters*, 316: 20-26.
- Vredenburg G., Braver-Sewradj S., Van Vurgt-Lussenburg B. M. A., Vermeulen N. P. E., Commandeur J., Chris Vos J. (2015) Activation of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 BM3 mutants. *Toxicology Letters*, 232: 182-192.
- Witt K.L., Bishop J.B. (1996) Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. *Mutation Research*, 355: 209-234.
- Whitwell J., Smith R., Jenner K., Lyon H., Wood D., Clements J., Aschcroft-Hawley K., Gollapudi B., Kirkland D., Lorge E., Pfuhler S., Tanir J. Y., Thybaud V. (2015) Relationships between *p53* status, apoptosis and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines in vitro: Implications for improving existing assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 790: 7-27.
- Zamorano-Ponce E., Lagos Muñoz P., Rivera Caamaño P., Fernández Romero J. (2008) Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimiopreención y anticarcinogénesis. *Theoria* 17: 71-86.
- Zhang J. Tian Q., y Zhou S-F. (2006) Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Current Drug Therapy*. 1: 55-84.



Universidad de Guanajuato
Campus Celaya – Salvatierra
División de Ciencias de la Salud e Ingenierías
Doctorado en Ciencias de Enfermería



CONSENTIMIENTO INFORMADO, PERSONAL EXPUESTO

**“AUTOCUIDADO EN LA PREPARACIÓN Y MANEJO DE
CITOSTÁTICOS Y SU RELACIÓN CON GENOTOXICIDAD EN EL
PERSONAL DE ENFERMERÍA”**

Al firmar este documento, doy mi consentimiento para participar en este proyecto de investigación, invitándoseme previamente, a que utilice el tiempo necesario para notificar mi decisión de manera libre y voluntaria sobre la inclusión o no dentro de este estudio. Se me ha explicado que este proyecto ha sido autorizado después de una exhaustiva revisión por parte del Comité Académico Interinstitucional del Doctorado en Ciencias de Enfermería de la Universidad de Guanajuato.

Se me ha comunicado que personal de enfermería de las siguientes instituciones del sector salud en Morelia, Michoacán participarán en este estudio: Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, Centro Estatal de Atención Oncológica, Hospital General “Dr. Miguel Silva”, Hospital de la Mujer y Hospital General “Vasco de Quiroga del ISSSTE y que todas ellas han autorizado de manera formal y por escrito la ejecución del proyecto, dicho permiso se obtuvo a través del Comité de Ética Estatal o de la institución según corresponda.

Me fue dado a conocer el objetivo de la investigación el cual consiste en: analizar el autocuidado en la preparación y manejo de citostáticos y su relación con genotoxicidad en el personal de enfermería y que he sido seleccionada para participar en dicha investigación en virtud de que de cumpla con los requisitos necesarios para la misma. También se me ha informado sobre el derecho que poseo de que aún, después de que se haya iniciado la investigación, puedo declinar a continuar, sin que esto tenga repercusiones en mi persona.

Se me ha avisado que las muestras me serán tomadas de sangre venosa periférica (cinco mililitros) y de la mucosa oral para ser analizados en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza (FEZ Zaragoza) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Para la toma de la muestra sanguínea, se me ha solicitado que informe a la persona responsable de la investigación, sobre la presencia de alguna infección durante los ocho días previos a la toma de la misma para diferir su obtención una semana después de que haya cedido dicho evento; también que comunique si he recibido tratamiento con antibióticos, ya que en tal caso, la recolección sanguínea se hará 15 días posteriores al término del mismo. De igual manera, se me solicitó que no ingiriera ningún tipo de bebidas alcohólicas 24 horas previas a la obtención de la muestra y que en caso contrario, lo notifique para postergar su recolección por espacio de un día. Igualmente, se me ha invitado a informar sobre la ministración de algún tipo de vacuna durante las tres semanas previas a la obtención de las muestras, para que estas sean recolectado al cumplir un mes después de su aplicación. Asimismo, se me pidió que no realice ningún tipo de actividad deportiva (ejercicios aeróbicos de bajo, mediano o alto impacto) 24 horas previas a la recolección y que en caso de que esto sucediera, lo notifique para programar su obtención un día después de dicho acontecimiento.

En relación a la toma de muestra de la cavidad oral, se me ha notificado que se obtendrán con un cepillo especial (citobrush), raspando suavemente la zona de ambos carrillos, previo a lo cual, me realizaré un aseo bucal con un cepillo y crema dental realizándome dos enjuagues con agua simple y al final uno con solución fisiológica; asimismo, se me ha comentado que el riesgo es mínimo en ambos procedimientos.

Me han manifestado que el lugar asignado para la obtención de las muestras será mi centro de trabajo, durante mi turno laboral y que en el supuesto caso de presentar algún problema durante los procedimientos y derivado de ellos, la atención será brindada por el profesional de la salud responsable de la investigación.

Se me ha avisado que los beneficios que obtendrá el personal de enfermería con la realización del estudio, es la detección de genotoxicidad y que se pretende gestionar con las autoridades competentes, rotaciones frecuentes del personal que prepara y maneja citostáticos, para con ello, disminuir la presencia de dicha

condición, además, incidir en relación a la mejora de las condiciones ambientales e institucionales, así como de la dotación de material y equipo ideales para la preparación y manejo de dichos fármacos.

Me han explicado que los datos obtenidos serán custodiados por el investigador responsable de la investigación y se me ha garantizado discreción y confidencialidad sobre mi identidad, de tal forma, que solamente este profesional tendrá acceso a lo anteriormente señalado, poder que le he conferido al firmar esta carta de consentimiento informado. Asimismo, se me ha comentado que una vez que se procesen las muestras, su desecho será de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM 087, referente a los residuos peligrosos biológico – infeccioso (RPBI). Entiendo que los datos serán conservados durante cinco años, transcurrido dicho tiempo, serán destruidos.

Se me ha notificado que en el supuesto caso de que me sea detectada alguna alteración en el ADN, no se puede afirmar categóricamente que sea producto del contacto con citostáticos, por lo cual, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados para una eventual demanda en contra de la institución para la cual laboro, ya que con esta investigación se pretende contar con información que permita el mejoramiento de las condiciones de trabajo a través de su gestión ante las autoridades correspondientes.

Morelia, Michoacán, de 20

Nombre y firma de la entrevistada

ME. Ma. Lilia Alicia Alcántar Zavala
Responsable de la investigación

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma de testigo

Se me ha notificado que para consulta de dudas sobre la ejecución del protocolo, por favor me dirija con la persona responsable de la investigación para que dé respuesta a las interrogantes que plantee.

Ma. Lilia Alicia Alcántar Zavala

Número teléfono celular: 44 31 80 55



Universidad de Guanajuato
Campus Celaya – Salvatierra
División de Ciencias de la Salud e Ingenierías
Doctorado en Ciencias de Enfermería



CONSENTIMIENTO INFORMADO, PERSONAL NO EXPUESTO

**“AUTOCUIDADO EN LA PREPARACIÓN Y MANEJO DE
CITOSTÁTICOS Y SU RELACIÓN CON GENOTOXICIDAD EN EL
PERSONAL DE ENFERMERÍA”**

Al firmar este documento, doy mi consentimiento para participar en este proyecto de investigación, invitándome previamente a que utilice el tiempo necesario para notificar mi decisión de manera libre y voluntaria sobre la inclusión o no dentro de este proyecto. Se me ha explicado que dicho proyecto ha sido autorizado después de una exhaustiva revisión por parte del Comité Académico Interinstitucional del Doctorado en Ciencias de Enfermería de la Universidad de Guanajuato.

Se me ha comunicado que personal de enfermería expuesto a citostáticos de las siguientes instituciones del sector salud participarán en este estudio: Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, Centro Estatal de Atención Oncológica, Hospital General “Dr. Miguel Silva”, Hospital de la Mujer y Hospital General “Vasco de Quiroga del ISSSTE y que todas ellas han autorizado de manera formal y por escrito la ejecución del proyecto, dicho permiso se obtuvo a través del Comité de Ética Estatal o de la institución según corresponda.

Me fue dado a conocer el objetivo de la investigación el cual consiste en: analizar el autocuidado en la preparación y manejo de citostáticos y su relación con genotoxicidad en el personal de enfermería, sin embargo, como el estudio es epidemiológico de casos y controles, he sido seleccionada dentro del grupo no expuesto para participar en dicha investigación en virtud de que de cumpla con los requisitos necesarios para la misma. También se me ha informado sobre el derecho que poseo de que aún, después de que se haya iniciado la investigación, puedo declinar a continuar en

la misma, sin que esto tenga repercusiones en mi persona.

Se me ha avisado que las muestras me serán tomadas de sangre venosa periférica (cinco mililitros) y de la mucosa oral para ser analizados en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza (FEZ Zaragoza) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Para la toma de muestras sanguíneas, se me ha solicitado que informe a la persona responsable de la investigación sobre la presencia de alguna infección durante los ocho días previos a la toma de las muestras para diferir su obtención una semana después de que haya cedido dicho evento; también que comunique si he recibido tratamiento con antibióticos, ya que en tal caso, la recolección sanguínea se hará 15 días posteriores al término del mismo. De igual manera, se me solicitó que no ingiriera ningún tipo de bebidas alcohólicas 24 horas previas a la obtención de la muestra y que en caso contrario, lo notifique para postergar su recolección por espacio de un día. Igualmente, se me ha invitado a informar sobre la ministración de algún tipo de vacuna durante las tres semanas previas a la obtención de las muestras, para que estas sean recolectadas al cumplir un mes después de su aplicación. Asimismo, se me pidió que no realizara ningún tipo de actividad deportiva (ejercicio aeróbico de bajo, mediano o alto impacto) 24 horas previas a la recolección y que en caso de que esto sucediera, lo notifique para programar su obtención un día después de dicho acontecimiento.

En relación a la toma de muestras de la cavidad oral, se me ha notificado que se obtendrán con un cepillo especial (citobrush), raspando suavemente la zona de los carrillos, previo a lo cual, me realizaré un aseo de la boca con un cepillo y crema dental y al final me llevaré a cabo un enjuague bucal con solución fisiológica; asimismo, se me ha comentado que el riesgo es mínimo en ambos procedimientos.

Me han manifestado que el lugar asignado para la obtención de las muestras será mi centro de trabajo, en el servicio de adscripción, durante mi turno laboral y que en el supuesto caso de presentar algún problema durante los procedimientos y derivado de ellos, la atención será brindada por el profesional de la salud responsable de la investigación.

Se me ha avisado que los beneficios que obtendrá el personal de enfermería expuesto con la realización del estudio, es la detección

de genotoxicidad y que se pretende gestionar con las autoridades competentes, rotaciones frecuentes del personal que prepara y maneja citostáticos, para con ello, disminuir la presencia de dicha condición, además, incidir en relación a la mejora de las condiciones ambientales y de la dotación de material y equipo ideales para dichos fármacos.

Me han explicado que los datos obtenidos serán custodiados por el investigador responsable de la investigación y se me ha garantizado discreción y confidencialidad sobre mi identificación, de tal forma que solamente este profesional tendrá acceso a lo anteriormente señalado, poder que le he conferido al firmar esta carta de consentimiento informado. Asimismo, se me ha comentado que una vez que se procesen las muestras, su desecho será de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM 087 referente a los residuos peligrosos biológico – infeccioso (RPBI). Entiendo que los resultados de la investigación me serán proporcionados si los solicito al investigador responsable al término del estudio y una vez que estos hayan sido publicados en revistas científicas; estos datos serán conservados durante cinco años, transcurrido dicho tiempo, serán destruidos.

Morelia, Michoacán, de 20

Nombre y firma de la entrevistada

ME. Ma. Lilia Alicia Alcántar Zavala
Responsable de la investigación

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

Se me ha notificado que para consulta de dudas sobre la ejecución del protocolo, por favor me dirija con la persona responsable de la investigación para que dé respuesta a las interrogantes que plantee.

Ma. Lilia Alicia Alcántar Zavala

Número teléfono celular: 44 31 80 55 89