



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Ensayo de micronúcleos en células
exfoliadas de mucosa oral como
biomarcador de genotoxicidad y
citotoxicidad en trabajadores de
una imprenta industrial expuestos
a compuestos orgánicos volátiles**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA
P R E S E N T A :
KARINA VANESA CALTZONTZIN GARCIA

ASESORA:

DRA. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

COSESORA:

DRA. BRENDA IVONN RODRÍGUEZ ROMERO

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral como biomarcador de genotoxicidad y citotoxicidad en trabajadores de una imprenta industrial expuestos a compuestos orgánicos volátiles.

Que presenta la pasante: Karina Vanesa Caltzontzin García
Con número de cuenta: 313630374 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Febrero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Maritere Domínguez Rojas</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. María Liasbeth Hernández Calderón</u>	
2do. SUPLENTE	<u>L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera</u>	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Dra. Maritere Domínguez Rojas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida, por darme fuerzas y por la gran bendición que es para mí estar terminando esta licenciatura.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme un lugar en sus aulas, por permitir que me hiciera de una carrera profesional y brindarme un conocimiento invaluable.

A la FES Cuautitlán Campo 1, porque en sus instalaciones adquirí las enseñanzas que hoy me hacen una licenciada en Bioquímica diagnóstica.

A mi mamá porque a pesar de todas las adversidades jamás se rindió para darme un mejor futuro, porque nunca soltó mi mano, pero más que nada por siempre brindarme su amor incondicional que me dio las fuerzas para llegar a este logro.

A Isai, mi novio, porque fue mi compañero en cada éxito y cada fracaso durante la carrera, fue quien nunca me dejó sola y siempre me impulsó a ser una mejor persona, porque me amó aun en los momentos de tempestad.

A la profesora Maritere Dominguez Rojas porque es una profesora que me transmitió todo su amor y pasión por la genética, y principalmente por confiar en mí para realizar esta tesis y darme todo su apoyo para poder titularme.

A mi Aby, mi abuelita, porque ha cuidado de mí incluso cuando creí que ya no lo necesitaba.

A Laura y Elizabeth, porque en ellas encontré más que buenas compañeras de trabajo, encontré amigas de verdad, las que te dan su apoyo incondicional.

A Brenda, mi mejor amiga, porque estuvo a mi lado creyendo en mí y hasta ayudándome con tareas aun cuando no entendía muy bien lo que hacíamos.

A mis amigos Miriam, Sarai, Chris, Montse y Diana, porque fueron personas en quien confiar y que me ayudaron cuando lo necesite.

A la Dra. Brenda por brindarme su apoyo y confianza para realizar este proyecto.

A todos esos profesores que transmiten sus conocimientos con toda la intención de hacer de los estudiantes grandes profesionales, que nos dan su apoyo para comprender y aprender.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi mamá, que ha sido y es el pilar más grande en mi vida, que me dio lo mejor que estuvo en sus manos y hoy puede ver aquí el fruto de su esfuerzo.

También la dedico a la memoria de mi papá, aunque solo estuvo a mi lado 8 años estoy segura que hoy sería el padre más orgulloso que pueda haber, que donde quiera que este sepa que siempre haré honor a su nombre.

Gracias a ambos porque construyeron lo que soy el día de hoy, a mi mamá porque sigue siendo mi mejor ejemplo de perseverancia y a mi papá porque, aun en la eternidad, me enseñó a dar todo a las personas que amamos.

Mi amor eterno será siempre de ellos.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	3
Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	6
Resumen.....	7
Introducción	
Capítulo 1. Compuestos orgánicos volátiles (COV)	
1.1 Concepto y clasificación.....	8
1.2 Efectos en la salud humana.....	9
Capítulo 2. Marco legal relacionado a compuestos orgánicos volátiles	
2.1 Legislación para COV en el mundo.....	10
2.2 Legislación para COV en México.....	11
Capítulo 3. Impresión industrial	
3.1 Concepto.....	13
3.2 Utilización de COV y sus riesgos.....	14
Capítulo 4. La técnica de micronúcleos	
4.1 Definición y antecedentes del ensayo de micronúcleos.....	17
4.2 Mecanismo de formación de micronúcleos.....	18
4.3 Ensayo de micronúcleos en mucosa oral	22
4.4 Biomonitorio y el ensayo de micronúcleos.....	25

4.5 Tinciones.....	25
Justificación.....	28
Objetivos.....	28
Materiales y métodos.....	29
Resultados.....	32
Discusión.....	41
Conclusiones.....	48
Referencias.....	49
Anexos.....	57

ABREVIATURAS

AN: Anormalidades nucleares

BMNCyt: Ensayo de micronúcleos en células exfoliadas bucales

BN: células binucleadas

BTEX: Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (incluidos isómeros)

CAT: Catalasa

CMN: Célula micronucleada

CL: Cariolisis

CX: Cariorrexis

COV: Compuestos Orgánicos Volátiles

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSB: Ruptura de doble cadena

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

GSH: Glutación

GSH-Px: Glutación Peroxidasa

GST: Glutación-S-Transferasa

HR: Recombinación homóloga

HUMNxl: Human micronucleus project on exfoliated buccal cells

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

MN: Micronúcleo

NHEJ: Mecanismo de unión de extremos no homólogos

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

NL: Núcleo lobulado

NO: Óxido Nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

SOD: Superóxido Dismutasa

SSB: Ruptura de Cadena Sencilla

U.S.E.P.A.: United States Environmental Protection Agency

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Formación de micronúcleos en una célula expuesta a un agente genotóxico.....19

FIGURA 2. Tipos de uniones huso acromático-cinetocoro durante la mitosis.....20

FIGURA 3. Mecanismo de formación de MN formados de fragmentos acéntricos o cromátides/cromosomas completos como resultado de DSB de DNA.....21

FIGURA 4. Representación esquemática de una sección transversal de la mucosa bucal normal.....24

FIGURA 5. Química de la tinción de Feulgen.....27

FIGURA 6. Células de mucosa oral observadas con tinción de Feulgen.....32

FIGURA 7. Media \pm E.E de micronúcleos en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$).....34

FIGURA 8. Media \pm E.E de núcleos lobulados en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$).....34

FIGURA 9. Media \pm E.E de células binucleadas en mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$).....35

FIGURA 10.	Media \pm E.E de cariorrexis en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$).....	35
FIGURA 11.	Media \pm E.E de cariólisis en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$).....	36
FIGURA 12.	Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y MN ($r = 0.01$, $p < 0.05$).....	37
FIGURA 13.	Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y NL ($r = 0.69$, $p < 0.05$).....	37
FIGURA 14.	Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y BN ($r = 0.05$, $p < 0.05$).....	38
FIGURA 15.	Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y CX ($r = 0.44$, $p < 0.05$).....	38
FIGURA 16.	Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y CL ($r = 0.76$, $p < 0.05$).....	39
FIGURA 17.	Ejemplos de agentes/actividades catalogados dentro del grupo 2B de la clasificación estándar de la IARC	41

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Clasificación de los COV con base en su peligrosidad.....	8
TABLA 2.	Características demográficas de la población en estudio.....	32
TABLA 3.	Frecuencia de biomarcadores en grupo de trabajadores expuestos a COV y grupo control	33
TABLA 4.	Comparación entre población problema y población control para cada uno de los parámetros medidos. Método: t de Student para muestras independientes, $\alpha=0.05$	33
TABLA 5.	Análisis de correlación con coeficiente de Pearson (r) entre anomalías nucleares y horas laborales ($p=0.05$).....	36
TABLA 6.	Frecuencia de biomarcadores en fumadores y no fumadores dentro del grupo expuesto a COV.....	39
TABLA 7.	Comparación entre individuos fumadores y no fumadores dentro de la población expuesta. Método: t de Student para muestras independientes, $\alpha=0.05$	40
TABLA 8.	Comparación de valores de AN/1000 células entre el presente estudio e investigaciones similares.....	42

RESUMEN

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son todos aquellos hidrocarburos que se presentan en estado gaseoso a la temperatura ambiente normal o que son muy volátiles a dicha temperatura. Muchos de estos COV, por ejemplo, el benceno y el 1,3-butadieno presentan efectos carcinogénicos, ya que son agentes inductores de leucemia (Hernández, 2017). En la impresión industrial, los COV como el tolueno, xileno o estireno, se emiten durante el proceso de impresión siendo estos los que han sido vinculados a casos de neurotoxicidad (Hadam, Reza y Mokhtari, 2017). El ensayo de micronúcleos, aplicado en diferentes tejidos, es una de las mejores técnicas citogenéticas validadas para evaluar el daño cromosómico en humanos. El ensayo de MN en un tejido que se divide rápidamente, como la mucosa bucal, permite la evaluación del daño al DNA sin la necesidad de una etapa de replicación celular *in vivo*. En el presente trabajo se tiene como objetivo evaluar si la exposición a compuestos orgánicos volátiles causa efectos genotóxicos en personal de una imprenta mediante el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral. La población expuesta se conformó de 91 trabajadores de una imprenta de la ciudad de México mientras que la población control fue constituida por 22 personas consideradas sanas para los fines del estudio. Se utilizó el método “*t de Student*” para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos. Los resultados son indicativos de genotoxicidad, evidenciados por un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos (MN) (2.03 ± 0.15 vs 0.32 ± 0.10) y núcleo lobulado (NL) (0.27 ± 0.05 vs 0.05 ± 0.03). También se evidenciaron defectos en la citocinesis representados por el aumento de células binucleadas (BN) (5.41 ± 0.37 vs 0.91 ± 0.12). A su vez, se demostró muerte celular con el incremento de células con cariorrexis (CX) (0.13 ± 0.03 vs 0.02 ± 0.02) y cariólisis (CL) (0.71 ± 0.08 vs 0.09 ± 0.07). Por otro lado, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para determinar si las horas laborales se encontraban relacionadas con el aumento de MN y las demás AN encontrando una relación positiva para cada una de ellas siendo MN ($r = 0.01$, $p < 0.05$), NL ($r = 0.69$, $p < 0.05$), BN ($r = 0.05$, $p < 0.05$), CX ($r = 0.44$, $p < 0.05$) y CL ($r = 0.76$, $p < 0.05$). Finalmente con una “*t de Student*” se comparó el grupo fumador y no fumador de la población expuesta encontrando que ninguna de las AN cambian significativamente ($p < 0.05$) por este factor teniendo los respectivos valores de MN (2.12 ± 0.23 vs 1.96 ± 0.20), NL (0.32 ± 0.08 vs 0.25 ± 0.06), BN (4.79 ± 0.51 vs 5.92 ± 0.51), CX (0.12 ± 0.04 vs 0.14 ± 0.05) y CL (0.72 ± 0.12 vs 0.70 ± 0.11). Se concluye que la exposición laboral a COV dentro de la impresión industrial induce genotoxicidad, muerte celular y defectos en la citocinesis, además de que hay una relación directa entre estos daños y las horas laborales. También se concluye que el tabaquismo no influye de ninguna manera en el aumento o disminución de las AN. Aunque la exposición a COV forma parte de la vida cotidiana debido a las emisiones generadas por grandes empresas, la exposición laboral se puede disminuir utilizando el equipo de bioseguridad adecuado.

INTRODUCCION

Capítulo 1. Compuestos orgánicos volátiles

1.1 Concepto y clasificación

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son todos aquellos hidrocarburos que se presentan en estado gaseoso a la temperatura ambiente normal o que son muy volátiles a dicha temperatura. Se puede considerar como COV aquel compuesto orgánico que a 20°C tenga una presión de vapor de 0.01 kPa o más, o una volatilidad equivalente en las condiciones particulares de uso (Ministerio para la transición ecológica, 2010).

Suelen presentar una cadena con un número de carbonos inferior a doce y contienen otros elementos como oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno. Su número supera el millar, pero los más abundantes en el aire son metano, tolueno, n-butano, i-pentano, etano, benceno, n-pentano, propano y etileno. Tienen un origen tanto natural (COV biogénicos) como antropogénico (debido a la evaporación de disolventes orgánicos, a la quema de combustibles, al transporte, etc.) (Ministerio para la transición ecológica, 2010).

La clasificación de los COV depende del parámetro empleado. La Agencia de Medioambiente del Reino Unido establece una clasificación de los COV en función de su peligrosidad. Esta clasificación, basada en la realizada por la TA-Luft alemana, es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación de los COV con base en su peligrosidad (Ministerio para la transición ecológica, 2010).

<i>Clase</i>	<i>Ejemplo</i>
Extremadamente peligrosos para la salud	Benceno, cloruro de vinilo y 1,2 dicloroetano
Compuestos de clase A (pueden causar daños importantes al medioambiente)	Acetaldehído, anilina, cloruro de bencilo, tetracloruro de carbono, acrilato de etilo, tricloroetano, triclorotolueno
Compuestos de clase B (con menor impacto en el medioambiente)	Acetona, etanol

La presencia de los COV está fundamentalmente influenciada por actividades en las que se empleen disolventes orgánicos. Algunas de las actividades donde es posible que se den emisiones de COV son:

- ❖ Pinturas y barnices (e industrias donde se usen éstos)
- ❖ Industria siderúrgica
- ❖ Industria de la madera
- ❖ Industria cosmética
- ❖ Industria farmacéutica

(Ministerio para la transición ecológica, 2010).

1.2 Efectos en la salud humana

Los COV afectan tanto de manera medioambiental como directamente sobre la salud del ser humano. Algunos COV, al ser contaminantes del medio ambiente, ingresan al cuerpo a través de la piel, por inhalación o por ingestión. Posteriormente, estos compuestos son metabolizados y exhalados (van de Kant et al., 2012).

Como efectos que pueden producir están problemas respiratorios, irritación de ojos y garganta, mareos, etc. También se pueden dar efectos psiquiátricos (irritabilidad, dificultad de concentración, etc.) (Ministerio para la transición ecológica, 2010).

Los efectos de los COV sobre la salud humana dependen de los siguientes factores:

- Del compuesto y su grado de toxicidad.
- De la vía de exposición: por inhalación, por ingestión o por contacto con la piel y puede causar:
 - A largo plazo: lesión de hígado, riñones, sistema nervioso central y cáncer.
 - A corto plazo: irritación de ojos y vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, náuseas, fatiga, alergias.

(Hernández, 2017)

- Concentración de COV (ppb)

(HealthLinkBC, 2018)

Varios COV han demostrado ser carcinógenos en estudios con animales cuando éstos fueron expuestos a altas concentraciones (Berkeley Lab, 2019). Muchos de estos COV, por ejemplo, el benceno y el 1,3-butadieno presentan efectos carcinogénicos, ya que son compuestos inductores de daño cromosómico que pueden causar leucemia; los aromáticos están clasificados como carcinogénicos y mutagénicos (Hernández, 2017).

Los riesgos de cáncer derivados de la exposición a estos COV se han estimado utilizando modelos de evaluación de riesgos y exposición. Algunas de estas estimaciones se basan en extrapolaciones de animales a personas y todas las estimaciones se basan en extrapolaciones de dosis altas (por ejemplo, ocupacionales industriales). Estos modelos generalmente estiman los riesgos para sustancias químicas individuales y, por lo tanto, no pueden proporcionar información sobre si las exposiciones a sustancias químicas simultáneas causan efectos mayores que (o menores que) la suma de sus efectos individuales (Berkeley Lab, 2019).

En el campo de la evaluación del riesgo de cáncer, el supuesto general de precaución ha sido que los riesgos de cáncer aumentan o disminuyen en proporción directa a la magnitud de la exposición al contaminante sin una concentración umbral (una concentración por debajo de la cual no existe un mayor riesgo de cáncer). Si esta suposición es correcta, se presume que cualquier nivel de exposición en interiores a carcinógenos conocidos plantea algún riesgo de cáncer (Berkeley Lab, 2019).

Capítulo 2. Marco legal relacionado a compuestos orgánicos volátiles

2.1 Legislación para COV en el mundo

En el marco internacional, se estableció en Europa la Directiva 1999/13/CE en el año 1999 para limitar la emisión de COV debidas al uso de disolventes orgánicos en determinadas actividades como limpieza en seco, fabricación de calzado, imprenta, procesos de recubrimiento, acabado de vehículos, entre otros. En esta norma se toman en cuenta los posibles efectos sobre la salud humana y la exposición profesional, particularmente a las actividades donde hay emisión de COV como en la industria de la imprenta (Hernández, 2017).

En España, la Ley 31/1995 de Prevención de Riesgos Laborales (LPRL), regula el derecho de los trabajadores a disponer de unas condiciones de trabajo que no perjudiquen su seguridad o salud. Uno de los pilares sobre el que se asienta es la denominada evaluación de riesgos, previa al inicio del trabajo, y de cuyos

resultados se derivan las medidas preventivas y condiciones que es necesario adoptar en cada puesto de trabajo en relación con cualquier tipo de riesgo existente (físico, químico, biológico, ergonómico, psicosocial, condiciones y actos inseguros, etc.) (Cavallé, 2011).

Concretamente, en materia de agentes químicos la normativa de desarrollo de la LPRL es el Real Decreto 374/2011. Es de destacar también la obligación del empresario de formar e informar a los trabajadores, de una forma eficaz y específica para el puesto de trabajo, sobre los riesgos y las medidas adoptadas para evitarlos de forma que puedan desarrollar su actividad de forma segura y saludable en todo momento. Las deficiencias en estos últimos aspectos son responsables, de una forma significativa, de un elevado número de accidentes laborales (Cavallé, 2011).

2.2 Legislación para COV en México

Con lo que respecta a México, en primer lugar se debe considerar la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, en la cual el artículo 123 relacionado al trabajo menciona:

Artículo 123, Toda persona tiene derecho al trabajo digno y socialmente útil; XIV. Los empresarios serán responsables de los accidentes del trabajo y de las enfermedades profesionales de los trabajadores, sufridas con motivo o en ejercicio de la profesión o trabajo que ejecuten; por lo tanto, los patronos deberán pagar la indemnización correspondiente, según que haya traído como consecuencia la muerte o simplemente incapacidad temporal o permanente para trabajar, de acuerdo con lo que las leyes determinen.

XV. El patrón estará obligado a observar, de acuerdo con la naturaleza de su negociación, los preceptos legales sobre higiene y seguridad en las instalaciones de su establecimiento (...), así como a organizar de tal manera éste, que resulte la mayor garantía para la salud y la vida de los trabajadores (Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, 1917 con reforma 2017).

Por lo que respecta a la Ley Federal del Trabajo:

*Título cuarto, Derechos y Obligaciones de los Trabajadores y de los Patronos
Capítulo I, Obligaciones del patrón. Artículo 132, Son obligaciones de los patronos
Fracción XVIII (...) se deberá difundir a los trabajadores la información sobre los riesgos y peligros a los que están expuestos (Ley Federal del Trabajo, 1º de abril de 1970, reforma 2015).*

Aunque ninguno de estos apartados mencionan a los COV explícitamente si se habla de la seguridad e higiene que debe ser proporcionada a los trabajadores independientemente del giro del empleo.

Actualmente están en vigencia tres normas oficiales mexicanas que tratan sobre niveles de emisión de COV, siendo las siguientes normas:

- NOM-075-SEMARNAT-1995, Que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles provenientes del proceso de los separadores agua-aceite de las refinerías de petróleo.
- NOM-121-SEMARNAT-1997, Que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles (COVs) provenientes de las operaciones de recubrimiento de carrocerías nuevas en planta de automóviles, unidades de uso múltiple, de pasajeros y utilitarios; carga y camiones ligeros, así como el método para calcular sus emisiones.
- NOM-123-SEMARNAT-1998, Que establece el contenido máximo permisible de compuestos orgánicos volátiles (COVs), en la fabricación de pinturas de secado al aire base disolvente para uso doméstico y los procedimientos para la determinación del contenido de estos en pinturas y recubrimientos.

Estas normas abarcan sectores como refinerías de petróleo, recubrimientos automotrices y fabricación de pinturas, sin embargo, se requiere regular contenido y tipo de COV en pinturas, adhesivos, selladores, solventes.

Además de estas NOM, hay otras más que, aunque no hablan específicamente de los COV si hablan de sustancia químicas peligrosas, exposición ocupacional y sus cuidados, por lo que deben ser tomadas en cuenta dentro de ambientes laborales donde exista una emisión de COV.

- NOM-030-STPS-2009, Servicios preventivos de seguridad y salud en el trabajo, funciones y actividades.
- NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

- NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral - Reconocimiento, evaluación y control.
- NOM-018-STPS-2000, Sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.
- NOM-047-SSA1-2011, Salud ambiental-índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.
- NOM-048-SSA1-1993, Que establece el método normalizado para la evaluación de riesgos a la salud como consecuencia de agentes ambientales.
- NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-salud, ambiental - Residuos peligrosos biológico - infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Capítulo 3. Impresión industrial

3.1 Concepto

La impresión industrial es el uso de técnicas de impresión para renderizar un artículo industrial, que podría ser casi cualquier cosa, incluidos jabones, champús, botellas y cigarrillos, etc. Sin embargo, la impresión industrial no se limita a los productos de fábrica, cuando se habla de membretes, tarjetas de presentación, carteles, volantes y otros medios impresos en grandes cantidades, también es una aplicación de impresión industrial (Waqas, 2016).

En general, la impresión industrial se divide en 4 tipos cuando se trata de marketing de impresión, según el tipo de clientes que atienden o el material de impresión con el que trabajan. Se debe tomar en cuenta que los diferentes productos impresos utilizan diferentes técnicas de impresión (Waqas, 2016).

- La impresión de envases, también denominada packaging, está relacionada principalmente con artículos de fábrica como cajas, bolsas, botellas, etiquetas, etc.
- La impresión de publicaciones, como se indica por nombre, está relacionada con periódicos, libros, revistas, etc.

- Las plantas son formas de impresión localizadas que solo se utilizan para una empresa específica.
- La impresión comercial es la forma más común de impresión industrial que sirve tanto a pequeños como a grandes clientes y se ocupa de una amplia variedad de servicios de impresión, incluidos artículos de papelería, folletos y revistas. Se ha convertido en un medio popular tanto para empresas grandes como pequeñas.

(Waqas, 2016)

Con respecto al área de packaging, se deben considerar diversos procesos para la impresión industrial, entre ellos están:

- Impresión offset
- Flexografía
- Impresión digital: inyección de tinta y xerografía
- Huecograbado

(Catalytic Products, sf)

La flexografía es un proceso utilizado principalmente para imprimir en una variedad de sustratos diferentes, incluyendo plástico, papel de aluminio, película de acetato y papel. Los productos típicos impresos con flexografía incluyen cajas corrugadas, envases flexibles entre los que están bolsas de compras y minoristas, bolsas y sacos de alimentos e higiene, cartones de leche y bebidas, plásticos flexibles, etiquetas autoadhesivas, vasos y recipientes desechables, sobres y papel tapiz (Catalytic Products, sf).

En este proceso de impresión, la placa flexográfica se entinta y el sustrato finalmente se intercala entre el cilindro de la placa y el cilindro de impresión para transferir la imagen. El sustrato alimentado por rollo pasa a través de un secador que permite que las tintas se sequen antes de que la superficie se toque nuevamente. La flexografía utiliza tintas muy fluidas (baja viscosidad) con un alto porcentaje en volumen de solvente orgánico (Catalytic Products, sf).

3.2 Utilización de COV y sus riesgos

La flexografía es una de las actividades industriales que utilizan ampliamente COV, los cuales se usan principalmente debido a su alta volatilidad. Las principales fuentes de emisión en las operaciones de impresión flexográfica son: líneas de aplicación de revestimiento, áreas de evaporación y hornos de secado (Catalytic Products, sf).

En los departamentos de impresión, las principales fuentes de COV son los solventes y las tintas, debido a su baja presión de vapor, cantidades significativas de tolueno, xilenos y otros compuestos volátiles se emiten durante el proceso de impresión (Hadad, Reza y Mokhtari, 2017). Las tintas utilizadas contienen COV como alcoholes, glicoles, ésteres, hidrocarburos y éteres que, cuando se evaporan durante el proceso de impresión, reaccionan en la atmósfera para formar ozono que puede causar efectos adversos en la salud humana (Catalytic Products, sf).

El “Manual de identificación de puntos de emisiones Fugitivas y conducidas, al aire, para industrias de Competencia estatal” reporta que las principales emisiones dentro de la industria gráfica son de COV provenientes de solventes y de diluyentes de tintas, las cuales se emiten durante su aplicación y secado, así mismo existen emisiones derivadas de los solventes utilizados en la limpieza (tanto su almacenamiento como manipulación) y como humidificadores (solución fuente). Durante el proceso de publicación pueden existir emisiones por el uso pegamentos y gomas. Entre otros componentes que se pueden identificar en estas emisiones están el xileno, MEK (Metil Etil Cetona) y tolueno. Pueden existir también emisiones de gases de combustión por el uso de combustible en el proceso de secado (López et al., sf).

Múltiples investigaciones reportan que el benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, abreviados como BTEX, están presentes en una gran variedad de productos incluyendo pinturas industriales, aerosoles, combustibles, materiales para la manufactura de pesticidas, plásticos, entre otros (De Aquino et al., 2016), además de ser los productos más mencionados dentro del ámbito que se estudia por lo que se les dará especial atención.

El benceno se absorbe por inhalación, ingestión y / o absorción dérmica y luego se convierte en metabolitos tóxicos por las oxidasas de función mixta en el hígado y la médula ósea. Los metabolitos pueden unirse covalentemente a macromoléculas celulares, causando interrupción del crecimiento celular y la replicación. La IARC y USEPA han clasificado independientemente el benceno como un carcinógeno humano del Grupo A y Clase 1, respectivamente, en base a evidencia suficiente de carcinogenicidad de estudios en humanos (Kuranchie et al., 2019).

Por su parte, según la OMS, el tolueno no es genotóxico ni cancerígeno para animales y humanos. Sin embargo, otros estudios revelan que el tolueno es cancerígeno para las ratas y tiene potencial tóxico para la reproducción (Christofoletti et al., 2013). El tolueno se convierte principalmente en alcohol bencílico y se excreta como hipurato. Como se mencionó, los datos humanos no

son concluyentes con respecto a la genotoxicidad del tolueno. Los estudios en trabajadores expuestos están limitados por la exposición concurrente a otras sustancias químicas, el pequeño tamaño de la población estudiada y la falta de monitoreo histórico de la exposición, además es probable que los métodos no sean lo suficientemente sensibles como para detectar manifestaciones pequeñas, pero significativas, de genotoxicidad (IARC, 2012)

Por su lado, el xileno tiene una acción neurotóxica manifestada por disfunción cognitiva, aumento de los niveles de catecolaminas hipotalámicas, hiperactividad y convulsiones. Sin embargo, según la OMS, el xileno no tiene potencial genotóxico o carcinogénico para humanos y animales de laboratorio (Christofoletti et al., 2013).

Los estudios de genotoxicidad en mezclas de xilenos y sus isómeros (los isómeros de xileno de m, o y p, difieren solo en la colocación de los dos grupos metilo en el anillo de benceno (Kuranchie et al., 2019)) han proporcionado resultados consistentemente negativos en una variedad de ensayos y sistemas de prueba in vitro e in vivo (bacterias, levaduras, células de mamíferos cultivadas, ratones, ratas y humanos). Sin embargo, los xilenos pueden causar fragmentación del DNA indirectamente, es decir, a concentraciones citotóxicas debido a las nucleasas liberadas por los lisosomas en las células en vías de muerte celular (IARC, 2012)

Por último, la IARC ha determinado que la exposición a largo plazo al etilbenceno puede causar cáncer en humanos (Kuranchie et al., 2019), sin embargo, muchas pruebas son contradictorias a este respecto.

Además, los procedimientos de limpieza pueden dar lugar a emisiones que son varias veces mayores que las emitidas durante otras tareas ya que los productos utilizados son a base de petróleo (Hadad, Reza y Mokhtari, 2017).

Las tintas utilizadas en el proceso de flexografía están hechas básicamente de una mezcla de resinas, aceites vegetales o minerales, pigmentos y solventes. Los ingredientes principales de las tintas convencionales son pigmentos, aglutinantes, portadores y aditivos. En comparación con la tinta a base de solvente, la tinta a base de agua utiliza como vehículo la misma para sustituir la mayoría de los solventes orgánicos y, por lo tanto, su desarrollo y aplicación conducen a la reducción de emisiones de COV como una de las principales fuerzas impulsoras de la innovación del producto (Hadad, Reza y Mokhtari, 2017).

Son muchos los procesos industriales que generan emisiones de COV, por ejemplo, la fabricación de recubrimientos y pinturas con cerca de un 46% de las emisiones totales, por su parte, el uso de tintas para impresión corresponde a un 6% de las emisiones (Coava y Tovar, 2009). Mencionado el uso de los COV en esta industria hay que hablar sobre los riesgos que se corren en la exposición laboral a estos compuestos.

A nivel epidemiológico existen casos tan relevantes como los del n-hexano (parálisis del calzado) y numerosa documentación relativa a casos de neurotoxicidad derivada del tolueno, xileno o estireno (Cavallé, 2011).

Si se valora el uso histórico y su evolución, se destaca la irrupción de los disolventes clorados a partir principalmente de la década de los 60 y 70, como alternativa a los aromáticos, muy inflamables y que, por lo tanto, supuso una mejora en términos de seguridad (incendios) pero no en términos de salud, puesto que su toxicidad es muy elevada. En la actualidad existen iniciativas encaminadas a la sustitución de los clorados por otros disolventes de menor peligrosidad y su descenso ya se ha observado (Cavallé, 2011).

Muchos COV muestran efectos neurotóxicos sobre el sistema nervioso central. En intoxicaciones agudas, los efectos son graduales según el nivel de exposición (cefaleas, cansancio, cambios de la conducta, efectos similares a la embriaguez, inconsciencia, coma). Los casos leves remiten al finalizar la exposición, mientras que las exposiciones elevadas pueden causar lesiones permanentes e incluso la muerte. En terminología de prevención de riesgos laboral se denominan comúnmente "narcóticos". La exposición prolongada y repetida a algunos COV suele causar cambios irreversibles para los que no se recupera la función normal como la encefalopatía crónica o el síndrome psicoorgánico debido a los COV, reconocido como enfermedad profesional en algunos países (Cavallé, 2011).

Capítulo 4. La técnica de micronúcleos

4.1 Definición y antecedentes del ensayo de micronúcleos

Los micronúcleos fueron identificados por primera vez a finales del siglo XIX cuando Howell y Jolly encontraron pequeñas inclusiones en eritrocitos de gatos y ratas. Estas inclusiones, denominadas cuerpos de Howell-Jolly también se observaron en eritrocitos de sangre periférica de pacientes con anemia severa. Siendo esta la primera descripción reportada de los micronúcleos (Hayashi, 2016).

En 1959, Evans y colaboradores trataron de evaluar la aberración cromosómica cuantitativamente. Este fue el primer informe para evaluar la aberración cromosómica por la frecuencia de células que contienen micronúcleos entre las células normales y estimaron que aproximadamente el 60% de los fragmentos cromosómicos contribuyeron a la formación de micronúcleos (Hayashi, 2016).

En 1983, el comité de micronúcleos del programa US-EPA Gene Tox reportó un resumen general que incluía una base de datos de resultados de pruebas de micronúcleos evaluando sustancias químicas. Los carcinógenos y los no carcinógenos se evaluaron mediante varios sistemas de pruebas *in vivo* y la prueba de micronúcleos obtuvo la mejor puntuación para estimar el potencial carcinogénico de los químicos entre los ensayos estudiados (Hayashi, 2016).

Durante este mismo año, la creencia de que los MN eran biomarcadores sensibles de genotoxicidad se confirmó mediante el desarrollo de protocolos recomendados, métodos de puntuación, niveles de dosis, elección de especies, diferencias de sexo, ensayos de cultivos celulares, *in vivo* y consideraciones estadísticas (Luzhna et al., 2013).

El proyecto de micronúcleos humanos (HUMN), establecido en 1997, es un programa de colaboración internacional destinado a estandarizar el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y evaluar los efectos del protocolo y los criterios de puntuación en los valores obtenidos. Esta parte del proyecto HUMN se completó y los resultados se publicaron en 2001 (Kashyap & Reddy, 2012).

4.2 Mecanismo de formación de micronúcleos

Por definición, los MN son una masa de cromatina que tiene forma de un pequeño núcleo, se originan a partir de fragmentos de cromátidas/cromosomas acéntricos o de cromátidas/cromosomas completos que quedan atrás en la anafase de las células en división y no se incluyen en el núcleo principal durante la telofase (Luzhna et al., 2013). Estos aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas. Están rodeados de membrana nuclear y en el citoplasma parecen pequeños núcleos, que son visibles al microscopio óptico (Matheus, Tibisay, y Bolaños, Alba; 2014). Los micronúcleos se asocian estrechamente con errores mitóticos y, por lo tanto, se consideran indicadores de aneuploidía e inestabilidad genómica (Kalsbeek & Golsteyn, 2017).

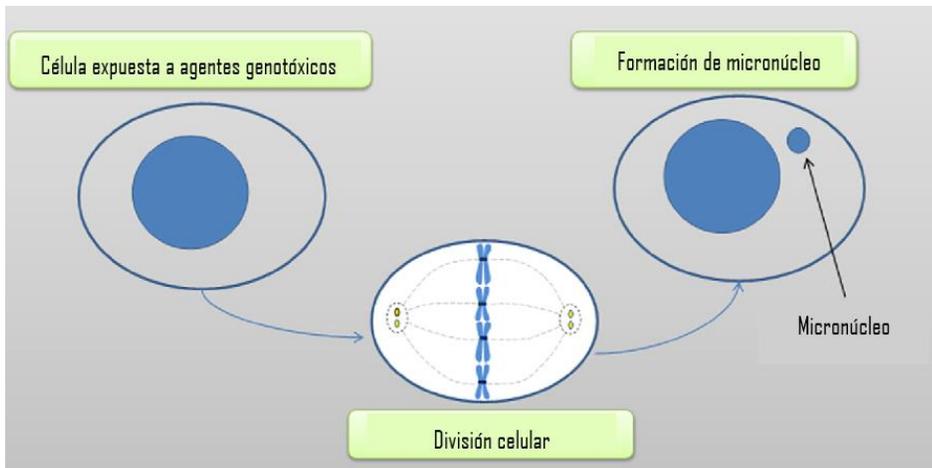


Figura 1. Formación de micronúcleos en una célula expuesta a un agente genotóxico (Modificado de Luzhna et al., 2013)

La formación de micronúcleos puede iniciarse por errores en la segregación de cromosomas o DNA dañado, que puede inducirse por factores químicos y físicos tal y como se representa en la figura 1. Los factores se dividen en dos grupos: aneunógenos y clastógenos. Los aneunógenos inducen la formación de micronúcleos que contienen cromosomas completos dirigidos a la segregación de los cromosomas en un núcleo. Por el contrario, los clastógenos dan como resultado micronúcleos que contienen fragmentos de cromosomas acéntricos, que son causados por la inducción de rupturas del DNA (Kalsbeek & Golsteyn, 2017).

La estructura de un MN depende de cómo se formó. Los factores químicos y físicos son atribuibles a los diferentes mecanismos a través de los cuales se pueden formar los micronúcleos. Estos mecanismos implican cambios en la cantidad de proteínas o defectos causados por la mutación que afecta la envoltura nuclear, la estructura de la región centromérica del cromosoma, la unión a microtúbulos del huso, ruptura de DNA de doble cadena, amplificación de oncogenes y cromosomas de doble minuto (Kalsbeek & Golsteyn, 2017).

Como ya se mencionó los MN pueden consistir en fragmentos acéntricos o cromátidas/cromosomas completos. Para formar un fragmento acéntrico, las rupturas de doble cadena (DSB) de DNA deben ocurrir en una cromátida hermana o extenderse a todo el cromosoma anafásico. Esto sucede solo si el nivel de DSB supera la capacidad de reparación de las células en división, lo que se debe principalmente a la mala reparación de las DSB por la recombinación homóloga (HR) disfuncional o defectos en las enzimas del mecanismo de unión

de extremos no homólogos (NHEJ). La formación de MN es a menudo el resultado de la reparación por escisión simultánea de los daños y la incorporación de la base incorrecta. Una falla en el evento de relleno de huecos apropiado lleva a DSB (Luzhna et al., 2013).

Con respecto a la formación de MN consistentes de cromátidas, la mala segregación de las cromátidas hermanas suele ocurrir debido a la ausencia o la unión inadecuada de los microtúbulos del huso acromático a los cinetocoros del cromosoma. Las uniones estables anfitélicas de los microtúbulos generan tensión en los cinetocoros, asegurando la orientación correcta de las cromátidas. Las uniones inestables microtúbulo-cinetocoro como las sintélicas (ambas cromátidas hermanas están unidas al mismo polo del huso), monotélicas (solo se une un cinetocoro sin la segunda cromátida hermana) o las merotélicas (un cinetocoro está unida a ambos polos del huso) no producen una tensión significativa, lo que hace que el enlace sea sensible a la disociación. Si no se corrigen, tales uniones conducen a una segregación inadecuada y pérdida de cromosomas, lo que resulta en aneuploidía y formación de micronúcleos, respectivamente (Luzhna et al., 2013). Cada una de los tipos de uniones mencionadas se representan en la figura 2.

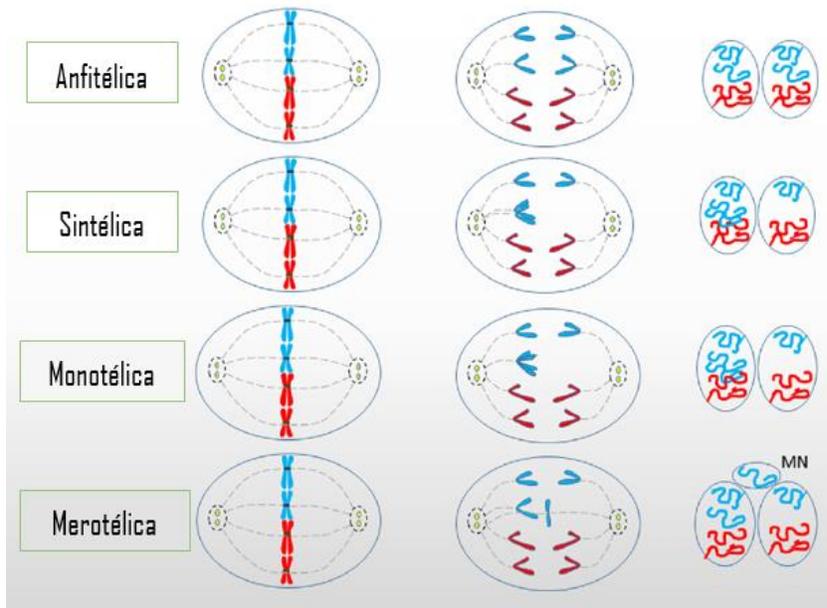


Figura 2. Tipos de uniones huso acromático-cinetocoro durante la mitosis (Modificado de Luzhna et al., 2013).

Según Fenech y colaboradores (2011), el principal mecanismo de formación de MN originado a partir de la mala segregación cromosómica es la hipometilación de las regiones centroméricas y paracentroméricas-repeticiones satélite. Por lo general, los satélites están hipermetilados y la pérdida de metilación alarga las regiones repetidas, lo que disminuye la tensión en los cinetocoros y crea conexiones erróneas entre los microtúbulos del huso mitótico y los cromosomas (Fenech et al., 2011). A veces, las cromátidas / cromosomas no pueden segregarse ya que el huso acromático no puede separarlos debido a la despolimerización de tubulina. (Luzhna et al., 2013).

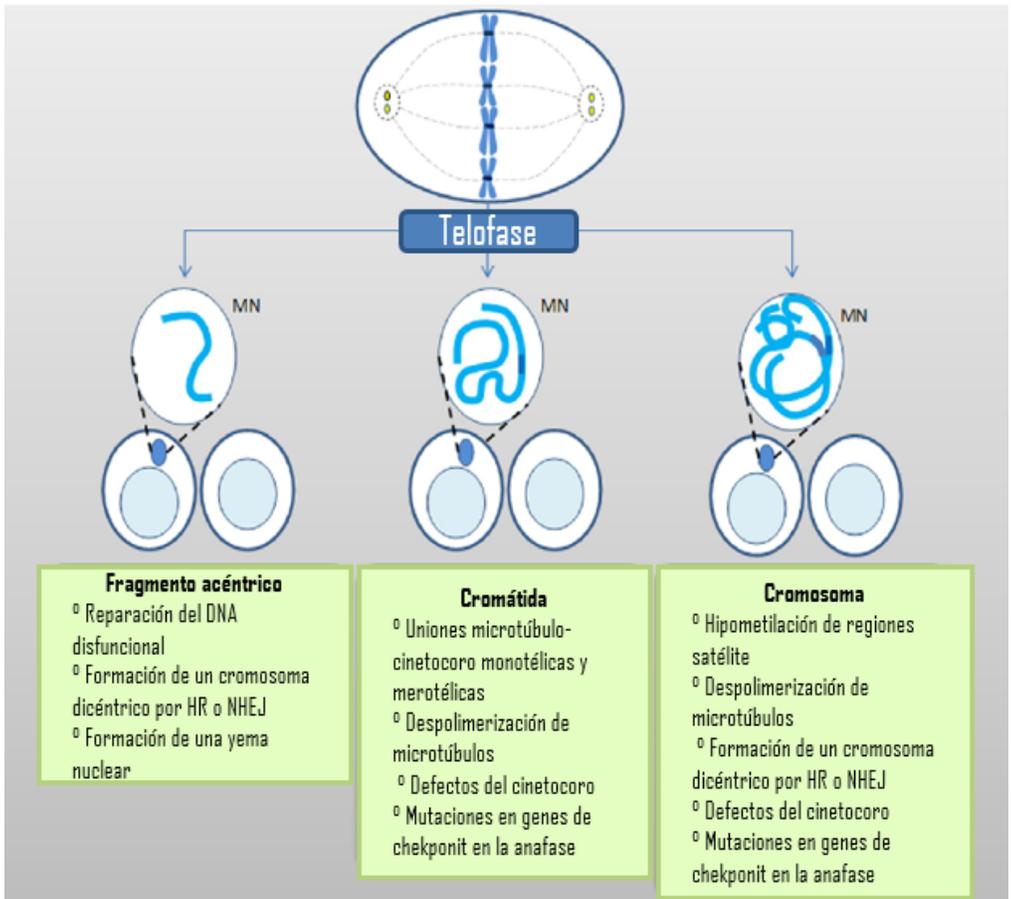


Figura 3. Mecanismo de formación de MN formados de fragmentos acéntricos o cromátidas/cromosomas completos como resultado de DSB de DNA (Modificado de Luzhna et al., 2013).

Por último, hay que mencionar a los cromosomas dicéntricos, estos son productos de HR entre secuencias de DNA complementarias de diferentes cromosomas o de NHEJ entre dos cromosomas que sufren de DSB de DNA. Teniendo dos centrómeros, un cromosoma dicéntrico puede unirse a dos cuerpos opuestos del huso que tiran de las cromátidas en direcciones opuestas. En ausencia de ruptura, la membrana nuclear rodea ambos núcleos formando un puente nucleoplasmático entre ellos. Eventualmente el puente nucleoplasmático se rompe durante la citocinesis, lo que resulta en una formación de MN's. (Luzhna et al., 2013). Los mecanismos mencionados para la formación de MN quedan resumidos en la figura 3.

4.3 Ensayo de micronúcleos en mucosa oral

El ensayo de micronúcleos, aplicado en diferentes tejidos, es una de las mejores técnicas citogenéticas validadas para evaluar el daño cromosómico en humanos. El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMNCyt) en linfocitos de sangre periférica es el método más frecuente en la evaluación biológica de poblaciones humanas para evaluar la exposición a agentes genotóxicos, deficiencia de micronutrientes o exceso e inestabilidad genética. Además, la evidencia científica reciente sugiere una asociación entre una mayor frecuencia de MN en los linfocitos y el riesgo de cáncer y otras enfermedades degenerativas relacionadas con la edad. El ensayo de micronúcleos aplicado en células exfoliadas bucales (BMNCyt) proporciona un método complementario para medir el daño en el DNA y los efectos citotóxicos en un tejido fácilmente accesible que no requiere cultivo *in vitro* (Bolognesi & Fenech, 2013).

El mecanismo de formación de MN en las células exfoliadas bucales es consistente con el modelo propuesto para los linfocitos. El ensayo de MN en un tejido que se divide rápidamente, como la mucosa bucal, permite la evaluación del daño al DNA sin la necesidad de una etapa de replicación celular *in vivo* justo como ya se había mencionado. Otra ventaja de este enfoque mínimamente invasivo es que se puede usar sin establecer un cultivo celular, una técnica normalmente asociada con los análisis metafásicos clásicos, y también con el análisis de interfase, como en el método de bloqueo de citocinesis en linfocitos binucleados (Bonassi et al., 2011).

No obstante, este ensayo permite la detección de otras anomalías nucleares como son los núcleos lobulado (NL), las células binucleadas, cariorrecticas y cariolíticas.

Las células con NL, "broken-eggs" o células con yemas nucleares se forman por la eliminación de DNA amplificado extracromosómico durante la interfase como

paso intermedio en la formación de micronúcleos de doble minuto, y también se producen a partir de los restos de puentes nucleoplásmicos rotos. Los puentes nucleoplásmicos se originan a partir de cromosomas dicéntricos que se forman a través de la reparación incorrecta de roturas de DNA y eventos de fusión de telómeros (Cheong et al., 2013).

Respecto a las células binucleadas (BN), son aquellas que contienen dos núcleos principales en lugar de uno, los cuales tienen la misma morfología e intensidad de tinción y son indicativas de la alteración citocinética mencionada. Su formación principalmente se asocia con aneuploidía, lo que refleja la inestabilidad genómica. Además, un estudio sugirió que en muchos tipos de células de mamíferos el primer paso para niveles más altos de ploidía es que las células se vuelvan binucleadas, y esto podría desempeñar un papel en la transformación maligna de una población celular determinada. Los mecanismos moleculares por los cuales se produce esta inducción están lejos de entenderse. Posibilidades como el mal posicionamiento de los centriolos, el efecto de los medicamentos sobre la polimerización de la tubulina, la interrupción causada por agentes químicos sobre los microfilamentos y los microtúbulos, o incluso un posible efecto sobre la polimerización de actina/miosina se han descrito (Oliveira et al., 2019)

Por otro lado, la muerte celular está representada por la presencia de células con CX y CL. La CX es la fragmentación destructiva del núcleo de una célula que está muriendo, por lo cual su cromatina se distribuye irregularmente en todo el citoplasma nuclear. En otras palabras, es una ruptura nuclear en fragmentos más pequeños, esto generalmente conduce a la CL, es decir una disolución progresiva de la cromatina dañada (Minhas et al., 2016)

Las células de la mucosa oral son células que entran en contacto por primera vez con diferentes productos potencialmente cancerígenos, como lo son el tabaco y el alcohol, por lo tanto, estas células son susceptibles a ser dañadas por estos agentes antes de que se reflejen en cualquier otra condición sistémica. Como estas células son altamente proliferativas, son responsables de causar más del 90% del cáncer epitelial. Por lo tanto, la aplicación de esta prueba en células epiteliales se considera una herramienta sensible para biomonitorizar el daño genético en la población humana. La detección de personas que tienen un mayor riesgo de transformación maligna es fundamental para prevenir y reducir el número de muertes, así como el tratamiento costoso y doloroso que se realiza en los pacientes (Metgud & Neelesh, 2018).

Respecto a los costos, un día de consulta en primer nivel es de \$798 y \$103 para estudios de laboratorios, de presentarse alguna patología, el paciente deberá

acudir a la consulta de especialidad con un costo de \$2, 237. En caso de hospitalización, un día se paga por \$8, 732 mientras que una sesión de quimioterapia en caso de alguna enfermedad cancerígena resulta ser de \$7, 113; en pesos mexicanos de acuerdo a los Costos Unitarios por Nivel de Atención Médica actualizados al 2020.

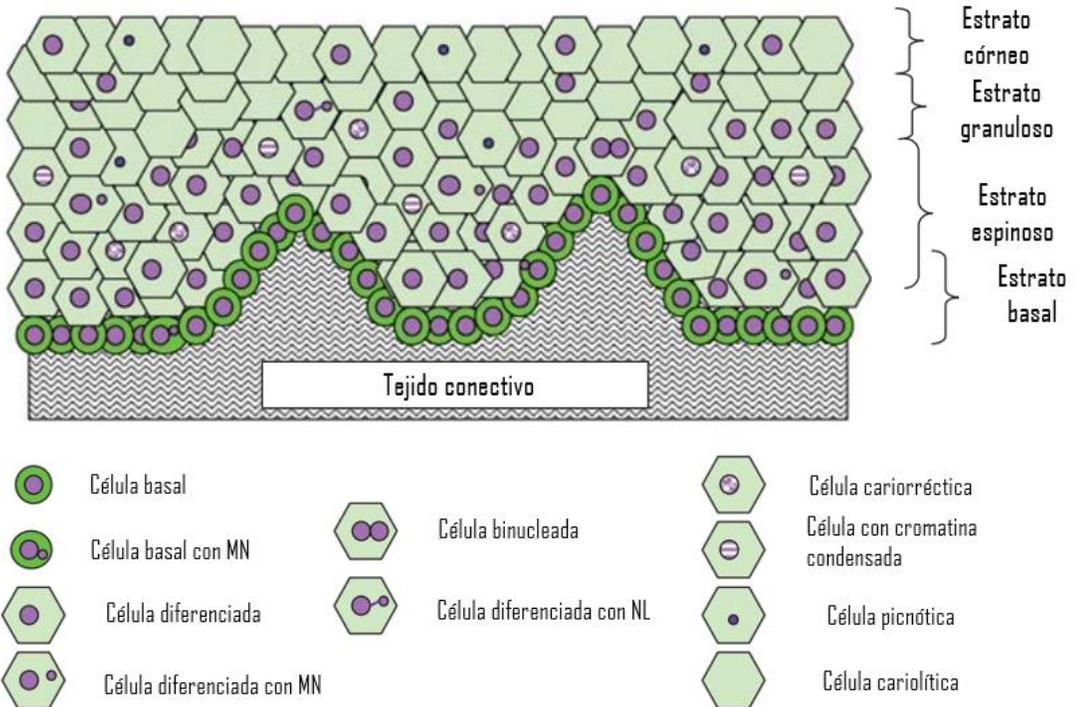


Figura 4. Representación esquemática de una sección transversal de la mucosa bucal normal. Se ilustran las diferentes capas celulares de individuos sanos, las posibles relaciones espaciales y los diversos tipos de células anormales (Modifica de Thomas et al., 2009).

Por otra parte, la mucosa bucal es un epitelio escamoso estratificado que consta de cuatro capas distintas. Los diversos tipos de células, las anomalías nucleares y las posibles interrelaciones espaciales entre los distintos tipos de células en la mucosa bucal, que se observan en un ensayo de BMNCyt, se muestran en la Figura 4 (Thomas et al., 2009).

4.4 Biomonitorio y el ensayo de micronúcleos

El biomonitorio humano es una metodología destinada a evaluar la exposición humana a agentes ambientales que son capaces de inducir efectos adversos a la salud. El biomonitorio humano puede medir los agentes (como productos químicos), sus metabolitos o productos de reacción en tejidos o muestras humanas, como sangre, orina, cabello, tejido adiposo y dientes. Éste se basa en el uso de biomarcadores, indicadores medibles de cambios o eventos en los sistemas biológicos. La principal ventaja de usar biomarcadores es intrínseca a su naturaleza, ya que representan una medición integradora de la exposición a un agente determinado que resulta de vías complejas de exposición humana, además incorpora información toxicocinética y características individuales como la susceptibilidad genética (Knudsen y Franco, 2012).

Con respecto a epidemiología molecular y citogenética, la frecuencia de MN en células exfoliadas se usa ampliamente como biomarcador para evaluar la presencia y el alcance del daño cromosómico en poblaciones humanas. Este ensayo tiene precisión y potencia estadística que se obtiene al realizar el conteo de un gran número de células. El ensayo de micronúcleos se ha utilizado ampliamente para evaluar el daño genético debido a las características del estilo de vida, la exposición ocupacional, las enfermedades y el riesgo ambiental. También tiene aplicaciones en el biomonitorio humano, la ecotoxicología, la evaluación del riesgo de cáncer, las pruebas de drogas farmacéuticas, entre otros (Yadav & Jaggi, 2015).

Además, la mínima invasividad de la recolección de células, el bajo costo, la facilidad de almacenamiento y de la preparación de los portaobjetos hacen que el ensayo de MN con células epiteliales bucales sea la elección ideal para estudios epidemiológicos moleculares. El BMNCyt propuesto por primera vez por Stich y colaboradores en 1982 aún continúa ganando popularidad como biomarcador de daño genético en numerosas aplicaciones. La prueba permite la detección de clastógenos y aneunógenos, además ofrece una gran oportunidad para evaluar la genotoxicidad mediante la cuantificación de micronúcleos, células binucleadas, núcleos lobulados, kariolisis, kariorrhexis, picnosis y cromatina condensada (Yadav & Jaggi, 2015).

4.5 Tinciones

Para que el BMNCyt tenga una aceptación y credibilidad generalizada en los estudios de población humana se requiere la estandarización del protocolo para cada uno de sus componentes como son los criterios de puntuación además de un

mejor conocimiento de las características críticas que afectan los resultados del ensayo (Bonassi et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que la fuente de variabilidad más importante y estadísticamente significativa para la determinar la frecuencia de MN es el método utilizado para teñir las células bucales. Se han observado frecuencias de MN más altas en los estudios que utilizan la tinción de Giemsa o acetorceína, lo que confirma que la baja especificidad de estas tinciones conduce a resultados falsos positivos en comparación con las tinciones específicas de DNA, como es la tinción de Feulgen (Bolognesi et al., 2013). Feulgen-Fast Green se ha establecido por defecto, ya que se identifica como el método de tinción de DNA más específico y versátil, además está recomendado en el protocolo HUMNxl (Bonassi et al., 2011).

Puede haber muchas posibilidades de por qué se observa una alta frecuencia de MN con las tinciones inespecíficas de DNA, las cuales pueden ser:

- Interpretación errónea de AN como CX, CL, BN como MN
- Formación de gránulos de queratina que se encuentran en células degeneradas con AN. Estos cuerpos redondos encontrados como consecuencia de una lesión celular no contienen DNA y pueden ser contados como MN
- Contaminación de bacterias.
- Otros: gránulos pequeños que se parecen MN, pero pueden ser diferenciados con su índice de refracción e intensidad de color.

(Metgud & Neelesh, 2018)

Además de estos puntos, las frecuencias de MN más altas observadas en los laboratorios que utilizan dichas tinciones podrían deberse a la puntuación de fragmentos no nucleares que se asemejan a MN, como pueden ser gránulos de queratohialina o las bacterias. Este tema ha sido discutido por Singh y colaboradores [1975], quienes enfatizaron que la ausencia de DNA en los gránulos de queratohialina se demuestra por el hecho de que el reactivo Feulgen no los tiñe, mientras que Giemsa puede teñirlos fácilmente debido a su estructura rica en proteínas. También se ha informado que los gránulos de queratohialina no solo se producen en células de la capa granular de la epidermis interfollicular de la piel, sino también en el epitelio oral (Bonassi et al., 2011).

Si bien, la tinción de Feulgen es un método citoquímico/topoquímico clásico que ha permitido a los investigadores revelar el DNA como componente de la cromatina y los cromosomas. Las imágenes Feulgen-positivas exhiben un color

magenta (rojo-púrpura) cuando se observan con microscopía de luz ordinaria o un color rojo con microscopía de fluorescencia (Mello & Vidal, 2017).

La reacción de Feulgen consta de dos pasos:

1. Hidrólisis ácida: generalmente realizada con una solución de HCl, la hidrólisis ácida desnaturaliza el DNA e induce la despurinación dando pie al desenmascaramiento de los residuos de desoxirribosa, lo que los hace funcionar como aldehídos.
2. Tratamiento con el reactivo de Schiff: un leucoderivado de la fucsina básica. La segunda fase de la reacción de Feulgen consiste en la reacción de los aldehídos de DNA que fueron expuestos por despurinación con el reactivo de Schiff que es específico para aldehídos y cetonas, el reactivo originalmente es incoloro o de color pajizo y al reaccionar da como resultado el producto de color magenta.

(Mello & Vidal, 2017)

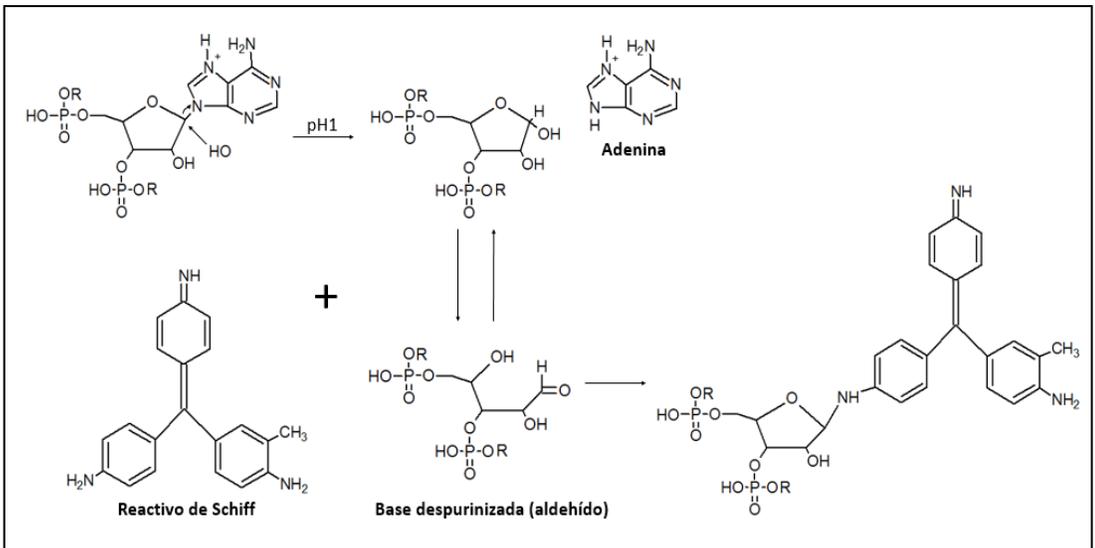


Figura 5. Reacción química de la tinción de Feulgen. (Modificada de Böcking, sf)

JUSTIFICACIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles son utilizados ampliamente en la flexografía como proceso de impresión industrial, sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto que la exposición a estos compuestos puede perjudicar la salud humana. En América Latina y el Caribe se estima que más de 30,000 personas mueren al año por exposición a sustancias químicas entre las que se encuentran los COV, aunado a esto, se tiene que los costos de atención médica se elevan por encima de los \$1000 cuando se trata de asistir a un médico especialista ante la presencia de una patología derivada de dicha exposición. Debido a estos datos, realizar un biomonitoreo en trabajadores expuestos a COV se vuelve de gran importancia con el fin de detectar si hay un daño genotóxico en trabajadores pertenecientes a la industria de la impresión antes de que manifiesten una patología que puede ir desde una enfermedad respiratoria hasta cáncer. Dado que el muestreo fue realizado por conveniencia se observa la falta de homogeneidad entre las poblaciones sin embargo esta se ve justificada con el tratamiento estadístico.

OBJETIVOS

GENERAL

Realizar un biomonitoreo a trabajadores de una imprenta mediante el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral para relacionar la genotoxicidad y citotoxicidad con la exposición a compuestos orgánicos volátiles.

PARTICULARES

- ✓ Cuantificar la frecuencia de micronúcleos y de núcleos lobulados como evidencia de genotoxicidad.
- ✓ Cuantificar la frecuencia de células binucleadas como evidencia de defectos en la citocinesis.
- ✓ Cuantificar la frecuencia de cariólisis y cariorrexis como indicadores de muerte celular.
- ✓ Relacionar los resultados obtenidos con los factores tabaquismo y horas laborales en la imprenta.

MATERIAL Y METODOS

Grupo expuesto a COV

La población de estudio fue constituida por 91 personas trabajadoras de una imprenta de la ciudad de México, considerando a personas con cargos obreros las cuales participaron por conveniencia al ser un proyecto de salud ocupacional por lo que la N quedó sujeta a la voluntad del número de participantes. Se realizó un cuestionario a cada uno de los trabajadores y se les proporcionó una carta de consentimiento informado (Anexos) los criterios tanto de inclusión como de exclusión considerados fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Ser trabajadores de la imprenta seleccionada
- Estar expuestos directa o indirectamente a los COV utilizados en la imprenta
- Estar en plena disposición de participar en el estudio
- Edad indistinta
- Sexo indistinto

Criterios de exclusión

- Padecer enfermedades bucales recientes (ulceras bucales, herpes labial)
- Presencia de sangrado o infección bucal al momento del estudio

Criterios de eliminación

- Muestras inadecuadas
- Abandono del estudio

Grupo control

La población control fue constituida por 22 personas consideradas sanas para los fines del estudio las cuales participaron por conveniencia al ser un proyecto de salud ocupacional por lo que la N quedó sujeta a la voluntad del número de participantes. Se les proporcionó una carta de consentimiento informado (Anexos)

Criterios de inclusión

- Estar en plena disposición de participar en el estudio
- Ser considerados clínicamente sanos
- Edad indistinta
- Sexo indistinto

Criterios de exclusión

- Estar expuestos a COV en su trabajo/ocupación
- Ser fumadores y alcohólicos
- Padecer enfermedades bucales recientes (ulceras bucales, herpes labial)
- Presencia de sangrado o infección bucal al momento del estudio

Criterios de eliminación

- Muestras inadecuadas
- Abandono del estudio

Toma de muestra

Previo a la toma de muestra se les proporciono un trago de agua para realizar un ligero enjuague bucal. Se realizó una serie de tres raspados en los carrillos internos de la boca con un aplicador de madera estéril, se raspo la mejilla derecha, la mejilla izquierda y por último, con el fin de aumentar el número de células colectadas se rasparon ambas mejillas. De cada raspado se realizó un frotis en un portaobjetos nuevo, limpio, previamente rotulado.

Procesamiento y tinción de laminillas

Las muestras se fijaron en metanol absoluto por 10 minutos hasta el momento de la tinción. Se realizó la tinción de Feulgen siguiendo los siguientes pasos:

1. Sumergir las laminillas en un vaso Coplin con solución de HCl 5M a 25°C por 15 minutos
2. Enjuagar las laminillas en un vaso Coplin con agua destilada por 3 minutos
3. Sumergir las laminillas en un vaso Coplin con reactivo de Schiff a 25°C por 90 minutos
4. Enjuagar las laminillas en un vaso Coplin con agua destilada por 10 minutos

Análisis microscópico

Las laminillas se observaron en un microscopio óptico de campo claro marca CETI a 10X y 40X. Por cada participante se analizaron 2000 células para identificar micronúcleos, núcleos lobulados, células binucleadas, kariolisis y kariorrhexis.

Análisis estadístico

Se generó una media \pm error estándar (E.E) de la media y se realizó una “t” de Student ($p < 0.05$) para determinar la existencia de diferencia significativas entre los valores de genotoxicidad (células micronucleadas y células con núcleo lobulado), daño citostático (células binucleadas) y muerte celular (cariorrexis y cariólisis) correspondientes al grupo expuesto a COV y al grupo control. Por otra parte se realizó un coeficiente de correlación de Pearson [El coeficiente de correlación de Pearson mide el grado de asociación entre variables e indica tanto dirección como magnitud. Por una parte su signo, positivo en cada caso, indica que a valores altos de una variable corresponden valores altos de la otra. La magnitud refleja la intensidad de la asociación entre las dos variables y mientras más cercano sea el valor a 1 más fuerte será la asociación (Camacho, 2008)] para observar si las horas laborales están relacionadas con el incremento o disminución de micronúcleos, núcleos lobulados, células binucleadas y células con cariorrexis y cariólisis. Finalmente se realizó una “t” de Student ($p < 0.05$) para determinar la existencia de diferencia significativas entre los valores de genotoxicidad (células micronucleadas y células con núcleo lobulado), daño citostático (células binucleadas) y muerte celular (cariorrexis y cariólisis) al comparar a la población expuesta fumadora y no fumadora

RESULTADOS

Como primer punto, se describe de manera general a las personas participantes en el estudio haciendo la distinción entre grupo expuesto a COV y grupo control.

Tabla 2. Características demográficas de la población en estudio

Característica	Grupo expuesto	Grupo control
Sujetos (n)	91	22
Genero		
Masculino	83	13
Femenino	8	9
Edad promedio	38 años	35 años
Patologías reportadas		
Si	15	0
No	76	22
Consumo de cigarrillos		
Fumador	41	0
No fumador	50	22

Los hallazgos observados en la muestra de mucosa oral con la tinción de Feulgen se muestran en la Figura 6.

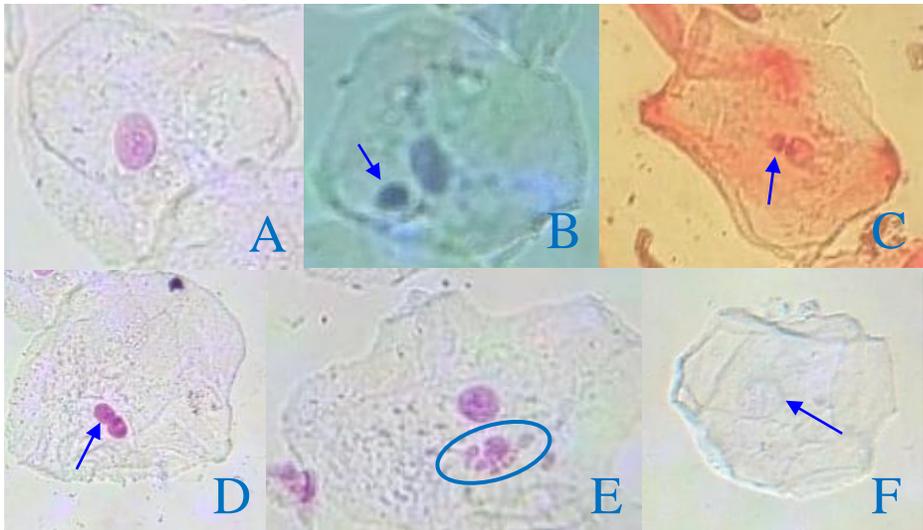


Figura 6. Células de mucosa oral observadas con tinción de Feulgen. (A) Célula diferenciada normal de mucosa oral con su núcleo en perfecto estado. (B) Célula micronucleada. (C) Célula con núcleo lobulado,

también denominado brote nuclear o “broken egg”. (D) Célula binucleada, se puede observar que los núcleos permanecen unidos. (E) Se observan 2 células empalmadas, el círculo amarillo denota el núcleo de una célula con cariorrexis. (F) Célula con cariólisis, el núcleo se ve vacío únicamente notando la membrana nuclear. Observado en microscopio óptico con objetivo 40x. Fuente: creación propia.

A continuación se muestra el promedio de cada una de las AN correspondientes a los grupos de estudio y su respectivo error estándar.

Tabla 3. Frecuencia de biomarcadores en grupo de trabajadores expuestos a COV y grupo control (media \pm error estándar).

Biomarcadores	Grupo expuesto a COV	Grupo control
Micronúcleos (MN)	2.03 \pm 0.15	0.32 \pm 0.10
Núcleos lobulados (NL)	0.27 \pm 0.05	0.05 \pm 0.03
Células binucleadas (BN)	5.41 \pm 0.37	0.91 \pm 0.12
Cariorrexis (CX)	0.13 \pm 0.03	0.02 \pm 0.00
Cariólisis (CL)	0.71 \pm 0.08	0.09 \pm 0.07

Con los datos recolectados se realizó una *t de Student* para cada AN con el fin de comparar el grupo expuesto a COV y el grupo control y así encontrar diferencias significativas que demostraran los efectos nocivos por la exposición a estas sustancias químicas.

Tabla 4. Comparación entre población problema y población control para cada uno de los parámetros medidos. Método: t de Student para muestras independientes, $\alpha=0.05$

Efecto evaluado	Daño celular	p<0.05	Conclusión	Consecuencia por COV
Genotoxicidad	MN	1.8 \times 10 ⁻¹⁵	Hay diferencia significativa	Daño genotóxico
	NL	1.1 \times 10 ⁻⁴		
Defectos en la citocinesis	BN	1.2 \times 10 ⁻²⁰		Daños en citocinesis
Muerte celular	CX	6.9 \times 10 ⁻³		Muerte celular
	CL	1.3 \times 10 ⁻⁷		

Para cada AN se construyeron gráficos donde se puede apreciar la diferencia entre los resultados promedio de ambos grupos. Para los MN, el hallazgo en el grupo expuesto a COV es 6 veces más grande que en el grupo control.

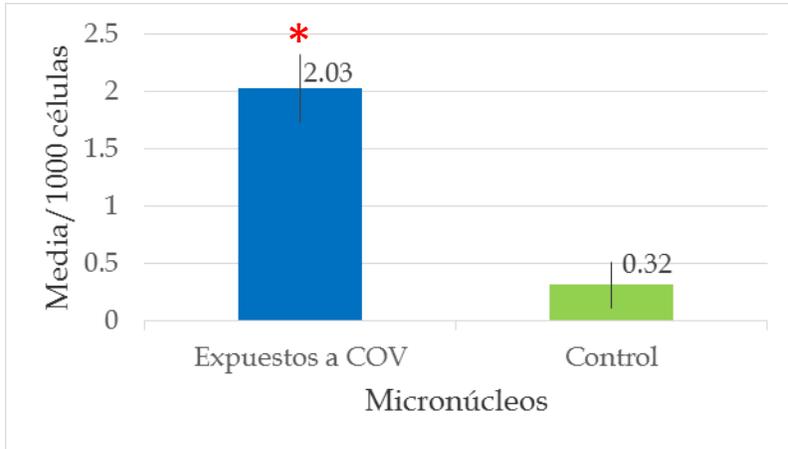


Figura 7. Media \pm E.E de micronúcleos en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$)

Con respecto al valor de NL, la diferencia es 5 veces mayor al compararse con el grupo control, estos resultados en conjunto manifiestan un daño genotóxico causado por la exposición a COV.

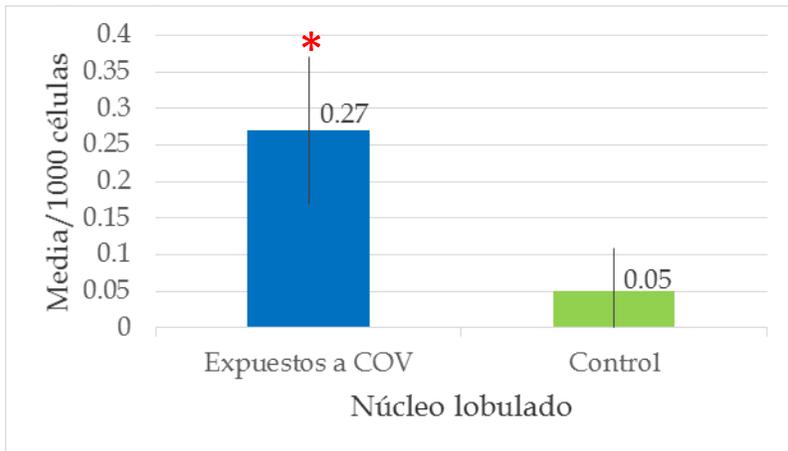


Figura 8. Media \pm E.E de núcleos lobulados en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$)

Los defectos en la citocinesis quedaron evidenciados con el índice de BN donde el conteo en el grupo expuesto fue casi 6 veces mayor que el del grupo control, quedando esto explícito con los resultados de la prueba de *t* de Student.

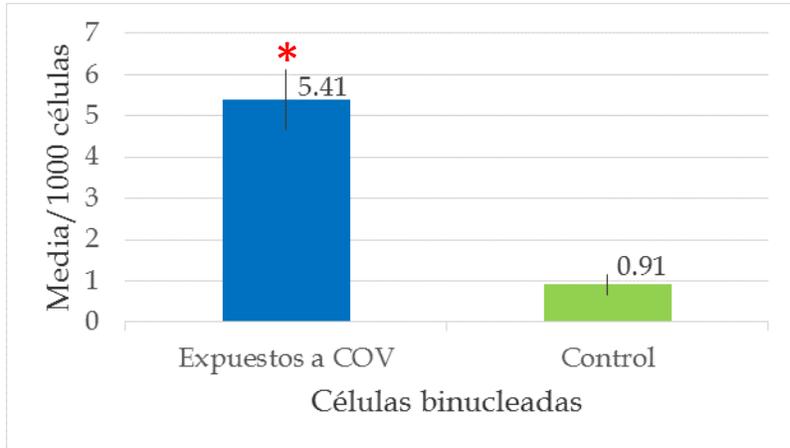


Figura 9. Media \pm E.E de células binucleadas en mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "*t* de Student" ($p < 0.05$)

Por otra parte, también se encontraron AN indicativas de muerte celular, en primer lugar se exponen los resultados obtenidos para la CX donde el grupo control obtuvo un valor 6 veces menor que el grupo expuesto a COV.

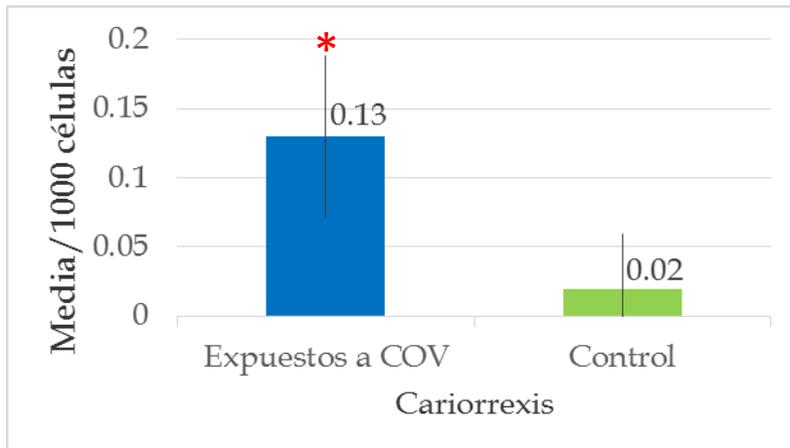


Figura 10. Media \pm E.E de cariorrexis en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "*t* de Student" ($p < 0.05$)

Esta última grafica representa los resultados para la CL, siendo la AN donde la magnitud de la diferencia entre los grupos es la mayor correspondiendo a cerca de 8 unidades.

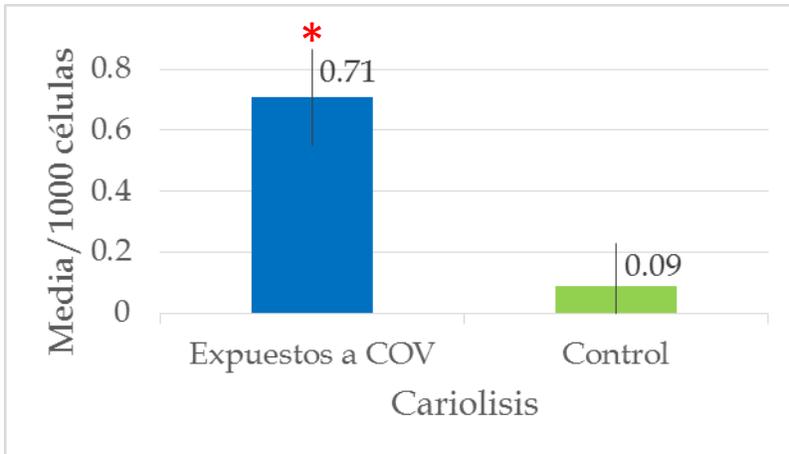


Figura 11. Media \pm E.E. de cariolisis en células de mucosa oral de población expuesta a COV y población control. *Diferencia significativa con prueba "t de Student" ($p < 0.05$)

Además de la comparación entre el grupo expuesto y el grupo control se buscó correlacionar los resultados de AN obtenidos en los trabajadores de la imprenta con las horas de sus jornadas laborales teniendo un rango de 7.5 hasta 10 horas, esto utilizando el conocido coeficiente de Pearson.

Tabla 5. Análisis de correlación con coeficiente de Pearson (r) entre anomalías nucleares y horas laborales ($p < 0.05$)

Biomarcadores	r	Relación	Magnitud	Interpretación
MN	0.01	Directa	Débil	Hay correlación directa
NL	0.69	Directa	Significativa	
BN	0.05	Directa	Débil	
CX	0.44	Directa	Moderada	
CL	0.76	Directa	Significativa	

Aunque la tabla 5 expone los valores de los coeficientes de Pearson (r) para cada AN la magnitud de la correlación queda mejor ejemplificada con gráficos. La figura a continuación representa la débil relación encontrada entre MN y horas laborales.

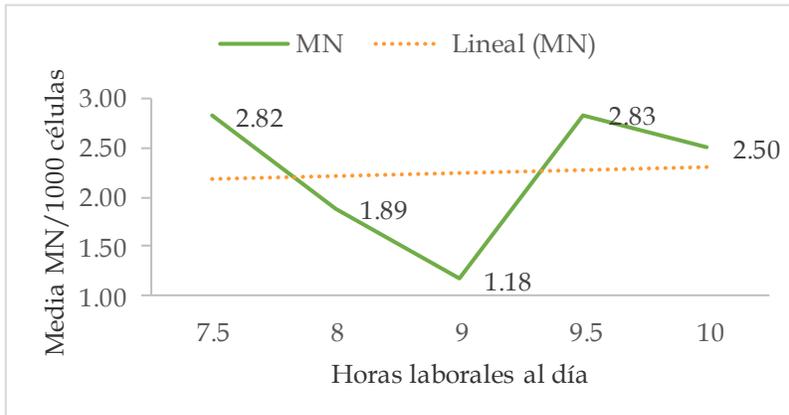


Figura 12. Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y MN ($r=0.01$, $p<0.05$)

La relación entre NL y las horas laborales es muy significativa como se observa en la figura donde la línea punteada muestra una fuerte correlación.

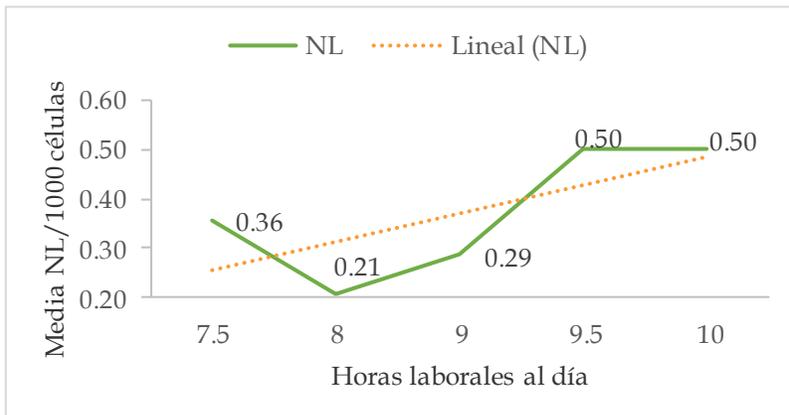


Figura 13. Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y NL ($r=0.69$, $p<0.05$)

Respecto a las BN la relación es muy débil, la línea punteada demuestra esto al observarse casi completamente recta.

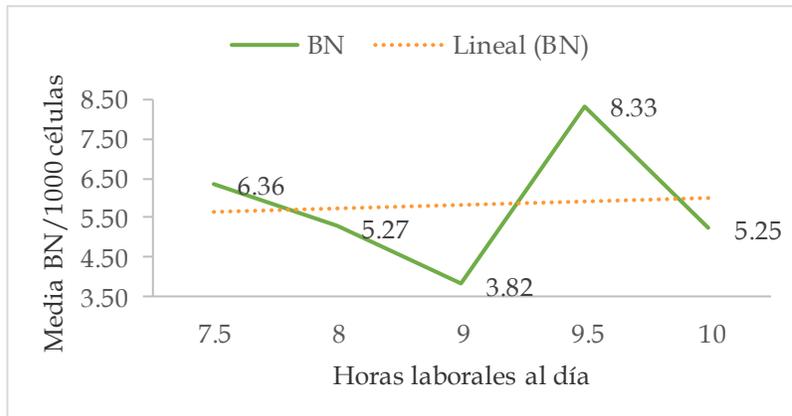


Figura 14. Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y BN ($r=0.05$, $p<0.05$)

Particularmente las AN relacionadas a muerte celular mostraron una relación firme, teniendo una r de 0.44 para la CX que se traduce en una recta con pendiente inclinada.

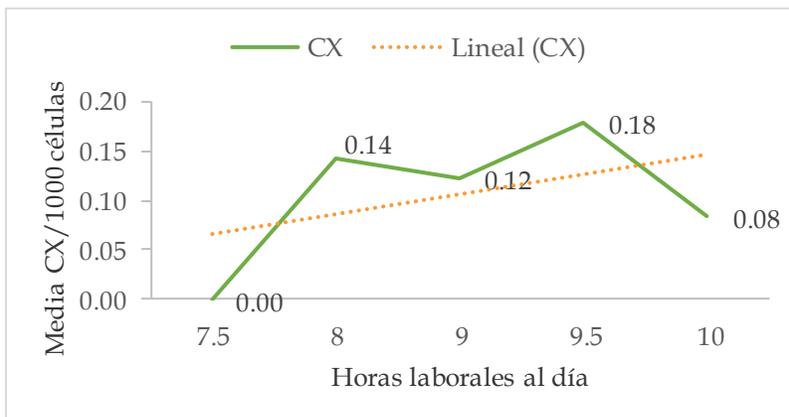


Figura 15. Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y CX ($r=0.44$, $p<0.05$)

Respecto a la CL se observa la r de mayor magnitud y por lo tanto la recta con mayor pendiente, haciendo evidente la estrecha relación entre las horas laborales con exposición a COV y muerte celular.

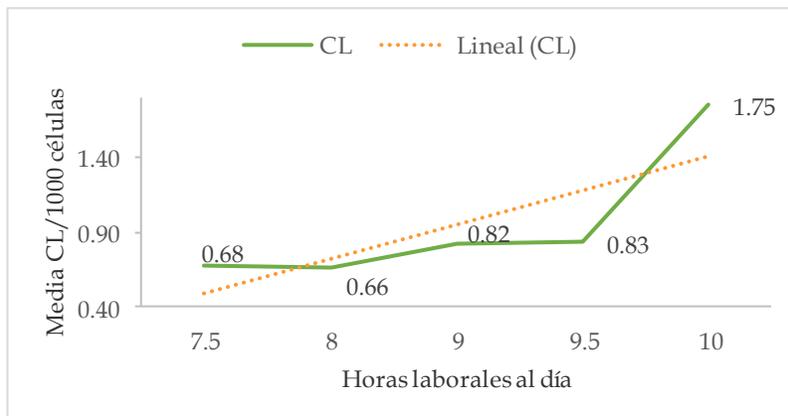


Figura 16. Representación del coeficiente de correlación de Pearson entre horas laborales al día y CL ($r=0.76$, $p<0.05$)

Por último se buscó una relación entre tabaquismo y exposición a COV realizando una *t de Student* comparando trabajadores fumadores y no fumadores. A continuación se enlistan en la tabla 6 los resultados promedios de ambos grupos y su respectivo E.E.

Tabla 6. Frecuencia de biomarcadores en fumadores y no fumadores dentro del grupo expuesto a COV (media \pm error estándar).

Biomarcador	Fumadores expuestos a COV	No fumadores expuestos a COV
Micronúcleos (MN)	2.12 \pm 0.23	1.96 \pm 0.20
Núcleos lobulados (NL)	0.32 \pm 0.08	0.25 \pm 0.06
Células binucleadas (BN)	4.79 \pm 0.51	5.92 \pm 0.51
Cariorexix (CX)	0.12 \pm 0.04	0.14 \pm 0.05
Cariolisis (CL)	0.72 \pm 0.12	0.70 \pm 0.11

Las *t de Student* realizadas por cada AN no demostraron ningún resultado significativo dado que todas las *p* fueron >0.05 por lo que no queda demostrada ninguna relación entre el tabaquismo y la exposición a COV.

Tabla 7. Comparación entre individuos fumadores y no fumadores dentro de la población expuesta. Método: *t* de Student para muestras independientes, $\alpha=0.05$

Efecto evaluado	Biomarcador	<i>p</i>	Conclusión
Genotoxicidad	MN	0.59	No hay diferencia significativa
	NL	0.49	
Defectos en la citocinesis	BN	0.12	
Muerte celular	CX	0.76	
	CL	0.90	

Cabe recalcar que al momento de tomar las muestras dentro de la fábrica se pudo constatar que los trabajadores únicamente utilizaban una cofia como equipo de seguridad mientras que algunos cuantos también usaban cubre bocas, sin embargo eran una minoría.

DISCUSIÓN

En el año 2014 el NIOSH estimaba que 9,8 millones de trabajadores en América Latina estaban expuestos a solventes orgánicos. De hecho la OMS incluye el trabajo en imprenta dentro del grupo 2B, es decir, estudios con animales han demostrado que este oficio posiblemente causa cáncer (Pablos, 2015).



Figura 17. Ejemplos de agentes/actividades catalogados dentro del grupo 2B de la clasificación estándar de la IARC (Pablos, 2015)

El presente estudio buscó determinar si la exposición a COV dentro de una fábrica dedicada a la flexografía repercute en daños genotóxicos y citotóxicos. Los resultados obtenidos con la prueba de “*t de Student*” al comparar la frecuencia de MN y las demás AN entre el grupo expuesto a COV y el grupo control indican que hay diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 4), lo que se traduce en el hecho de que la exposición a COV dentro de la impresión industrial implica daños al DNA, defectos en la citocinesis y también la inducción de muerte celular.

Ya que los valores de genotoxicidad y citotoxicidad son estadísticamente significativos vale la pena compararlos con aquellos obtenidos en investigaciones donde el BMNCyt fue usado con el mismo propósito. En la tabla 8 se encuentran los valores obtenidos en este proyecto y los que se obtuvieron en trabajadores de diversas indoles expuestos a COV.

Tabla 8. Comparación de valores de AN/1000 células entre el presente estudio e investigaciones similares

Biomarcador	Imprenta ¹	Central termoelectrónica ²	Bomberos ³	Gasolinera ⁴	Pintores de autos ⁵	Centros industriales ⁶
MN	2.03vs0.32	1.8vs0.2	3.91vs1.25	2.18vs0.45	6.9vs2.2	10.20vs7.73*
NL	0.27vs0.05	NR	5.69vs1.73	NR	NR	NR
BN	5.41vs0.91	NR	NR	NR	NR	12.90vs6.20
CX	0.13vs0.02	82.4vs58.3	24.12vs1.48	NR	NR	NR
CL	0.71vs0.09		152.6vs21.5	NR	NR	10.09vs5.00

Los valores se reportan como media del grupo expuesto vs media del grupo control, respectivamente.

NR: no reportados. *: Diferencia no significativa

¹Presente estudio

²García et al., 2012

³Ranjan et al., 2005

⁴Salem et al., 2018

⁵Martino, Viégas & Roth, 2003

⁶Dominguez et al., 2005

Todos los valores reportados mostraron diferencias significativas en los estudios correspondientes a excepción del valor para MN en los trabajadores de centros industriales. Aun cuando dicho valor es discrepante, los 4 valores más correspondientes a MN son similares a los obtenidos en este estudio lo que respalda la afirmación de que los COV tienen efectos genotóxicos. Similar a esto, otros estudios han demostrado un aumento correlacionado en MN y NL en células tratadas con mitomicina C (Cheong et al., 2013), un reconocido quimioterapéutico genotóxico.

Para las demás AN los valores reportados son mayores por una gran diferencia con respecto a los valores obtenidos, sin embargo mantienen la aseveración de que los COV inducen daños genotóxicos y citotóxicos. La gran diferencia entre valores puede radicar en la concentración de COV ambiental correspondiente a cada situación laboral además de factores como antigüedad en el empleo, medidas de bioseguridad, horas laborales, entre otros.

Antes de proseguir, hay que retomar la importancia que recae en el protocolo de tinción elegido para el BMNCyt. En este proyecto se eligió la tinción de Feulgen estandarizada dentro de los laboratorios de la FESC-1, esto se debe a que es una tinción específica de DNA que además ofrece una apariencia transparente del citoplasma, lo que da paso a que la identificación de MN y AN sea más fácil y exacta (Metgud & Neelesh, 2018).

Continuando, para poder dar razón de los daños evidenciados hay que tener en cuenta los COV a los que se exponen los trabajadores en cuestión. La imprenta en la que se realizó el biomonitorio reporta el uso de diversos solventes orgánicos,

acetato de etilo, alcohol isopropílico, ésteres, glicóéteres y mezclas de hidrocarburos. Además de estos, se consideran los mencionados BTEX por su importancia dentro de la impresión industrial.

El daño genético inducido por exposición ocupacional a COV puede deberse principiante al benceno con un considerable efecto por lo co-exposición a tolueno y xileno. Además, la exposición ocupacional al benceno puede causar daños en el DNA. Los resultados del metabolismo del benceno, como las EROs (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) pueden ser la causa principal del daño a las biomoléculas lo cual pueden provocar daños en el DNA como son los MN y las demás AN (Salem et al., 2018).

Christofolletti et al., sugieren que los MN formados en células expuestas a BTEX se deben principalmente a roturas cromosómicas, ya que varios estudios indican que el benceno es generalmente clastogénico, aunque aductos de DNA inestables, daño oxidativo e interrupción del huso también pueden ser responsable de estos efectos genotóxicos y citotóxicos (Christofolletti et al., 2013).

Dado que los trabajadores están expuestos a mezclas complejas de COV presentes en las tintas, fijadores, y demás productos, es difícil atribuir el daño genotóxico a cualquier compuesto en particular. Por lo tanto, el daño al DNA debe atribuirse al efecto acumulativo de muchos compuestos químicos que se utilizan en el ambiente laboral (De Oliveira et al., 2011), en este caso dentro de la impresión industrial.

Por su parte, la muerte celular programada o la apoptosis es una autodestrucción de una célula dada debido a un daño irreparable. Datos de la literatura muestran que el benceno, el tolueno y el xileno inducen la apoptosis y la genotoxicidad en modelos in vitro y también in vivo (Singh et al., 2011). En este sentido, la exposición a BTEX como COV con sus respectivos modos de acción justifican la genotoxicidad y la inducción de la muerte celular.

La explicación de los incrementos significativos en la frecuencia de binucleación en los trabajadores expuestos es más difícil ya que los solventes habitualmente forman mezclas complejas muy variables en las áreas de trabajo y complican el proceso de exposición. Todo ello trae como consecuencia que no existan suficientes evidencias epidemiológicas sobre la responsabilidad de cada uno de ellos, o sus combinaciones en las perturbaciones celulares encontradas o en la inducción de cáncer (Dominguez et al., 2005).

Se considera de importancia mencionar que estudios han descrito a los polvos de tóner y las impresoras láser como una fuente de partículas en

suspensión, que pueden contribuir a los efectos genotóxicos observados. Por lo tanto, se debe analizar una posible causa de daño al DNA por los polvos de tóner (Tang et al., 2012).

En un estudio realizado con trabajadores de tiendas de copiado se demostró que la exposición a impresoras láser inducía significativamente la formación de MN. Aunque este proyecto se realizó con el ensayo de micronúcleos en cultivo con células A549 (epitelio pulmonar humano) sometidas a emisiones de impresoras, se resalta el hecho de que se observó una inducción de MN significativa al ser comparada con el control. Aun cuando las condiciones experimentales son distintas, la analogía con la exposición a emisiones de impresoras y sus efectos puede dar razón de la aparición de estos MN.

Se sospecha que este efecto está asociado con la liberación de partículas durante el proceso de impresión, especialmente ultrafinas / nanopartículas. Se sabe que la inhalación de partículas ultrafinas puede causar inflamación y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y el daño al DNA por EROs es un paso crucial en el proceso de genotoxicidad por partículas (Tang et al., 2012).

Buscando una explicación completa a los efectos genotóxicos y citotóxicos observados se dará lugar a las EROs mencionadas, ya que juegan un papel más importante de lo pensado. El incremento en el daño al DNA por la exposición ocupacional a COV puede explicarse basándose en el metabolismo oxidativo de BTEX, ya que sus metabolitos intermediarios dan lugar a EROs las cuales oxidan el DNA. Además, estos metabolitos pueden producir aductos de DNA generando modificaciones al material genético como pueden ser DSB y SSB de DNA (Villalba et al., 2016)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son agentes citotóxicos que causan un daño oxidativo al atacar la membrana celular y el DNA. Los COV pueden causar lesiones en los pulmones, el hígado, los riñones, el cerebro y otros órganos al formar EROs, si éstas se producen en exceso y no se elimina a tiempo, llevan al estrés oxidativo resultando en la acumulación de proteínas disfuncionales, productos de peroxidación lipídica y DNA nuclear o mitocondrial dañado (Wang et al., 2013).

En general, el estrés oxidativo causado por los COV se considera uno de los mecanismos más importantes atribuibles a su toxicidad, especialmente para aquellos compuestos químicos lipofílicos, resaltando que por esta naturaleza tienen una mayor tendencia a acumularse en mujeres.

Un desequilibrio entre las EROs y las defensas antioxidantes desencadena un gran estrés oxidativo. La importancia de esto radica en que los COV no solo causan una elevación significativa en la generación de EROs sino que también se ha demostrado que dañan las defensas antioxidantes (Wang et al., 2013). A continuación se mencionan algunas de estas defensas y como los daños en estas repercuten de gran manera en los resultados explicados en este proyecto.

La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) cataliza la dismutación de H_2O_2 en H_2O , de esta manera brinda protección contra EROs. En el estudio realizado por Wang y colaboradores con ratones, la exposición a COV disminuyó la actividad de GSH-Px en los tejidos pulmonares. Esta enzima se encarga de proteger los tejidos del radical hidroxilo ($\bullet OH$), el cual es altamente reactivo y viene derivado de la degradación de H_2O_2 , por lo tanto, la disminución de la actividad de GSH-Px aumentó el efecto tóxico de los radicales libres formados por el efecto de los COV (Wang et al., 2013).

Hablando de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se debe recordar que esta proporciona citoprotección contra el daño inducido por los radicales libres mediante la conversión de estos a H_2O_2 en peroxisomas y mitocondrias. La actividad de eliminación de EROs efectuada por SOD solo es efectiva cuando es seguida por la acción de la catalasa (CAT), ya que la actividad dismutasa de SOD genera H_2O_2 la cual se elimina mediante la enzima CAT, que lo convierte en agua y oxígeno molecular (O_2). En el mismo estudio la actividad de SOD en ratones expuestos a COV disminuyó (Wang et al., 2013), lo que se traduce en un menor efecto de citoprotección.

La última defensa antioxidante por mencionar es el glutatión (GSH), el cual actúa directamente como antioxidante y también participa en ciclos catalíticos de varias enzimas antioxidantes como GSH-Px y GSH reductasa. La reducción de GSH involucra un fracaso en el sistema antioxidante primario para actuar contra los radicales libres, por lo tanto la disminución en la concentración de GSH indica una mayor generación de EROs, que causan peroxidación lipídica (Wang et al., 2013). Esto significa que la exposición a COV también disminuyó la concentración de GSH implicando estrés oxidativo.

Los resultados del estudio de Wang y colaboradores son consistentes con estudios previos que informaron la disminución en la concentración de GSH en el hígado en ratas administradas con COV. Además, el agotamiento de GSH da como resultado un aumento de óxido nítrico (NO) sintasa que puede conducir a la formación de NO excesivo, y el exceso de NO puede reaccionar rápidamente con EROs dando como resultado la formación del anión peroxinitrito ($ONOO^-$) que puede causar daño oxidativo (Wang et al., 2013).

En conjunto, los mecanismos genotóxicos de los COV mencionados (BTEX) y su correspondiente inducción de EROs desencadenan daños directos e indirectos a través de una baja en las defensas antioxidantes, lo cual es bien sabido que induce daños genotóxicos y citotóxicos. Ya que se ha dado detalle del porque la exposición a COV indujo las AN observadas se da paso a los resultados que indican una correlación entre AN y horas laborales dentro de la imprenta en cuestión.

La mayoría de estudios citogenéticos realizados en pintores informan un aumento en los niveles de daño genético, como aberraciones cromosómicas, formación de MN, intercambio de cromátidas hermanas y SSB de DNA. Lo que se debe resaltar es que varios estudios mostraron una asociación dosis-respuesta con la duración del trabajo (Straif et al., 2008). Aunque se hace mención del oficio de pintor y no dentro de una imprenta estas labores están estrechamente relacionadas por la exposición a punturas, solventes, fijadores, y principalmente COV.

En este caso se logró relacionar el incremento de MN y AN con las horas laborales diarias de cada trabajador. Aunque no se midió la concentración de COV ambiental dentro de la imprenta, los encargados reportan que los trabajadores se exponen a 20 L de solventes por jornada. Aun con este dato, se debe tener en cuenta que no todos los individuos laboran las mismas horas ya que el rango va de 7.5 a 10 hrs.

Los valores obtenidos del coeficiente de correlación de Pearson se traducen en “a más horas laborales con exposición a COV, mas AN”, esto por el signo positivo, respecto a la magnitud todos los valores fueran mayores a 0 sin embargo no todos demostraron una asociación fuerte.

Se resalta que De Aquino y colaboradores en 2016 demostraron una correlación positiva entre la frecuencia de daño al DNA y el tiempo de trabajo, esto también en trabajadores expuestos a COV, por lo que los resultados obtenidos son consistentes.

Retomando, las AN que presentan una asociación débil son MN y BN, moderada para CX mientras que NL y CL tienen una asociación fuerte. Como se mencionó, las concentraciones a las que los trabajadores se exponen se desconocen, pero aun si estas fuesen bajas, la falta de medidas de seguridad contribuye a una exposición crónica, y mientras más horas se esté expuesto a estos compuestos mayor oportunidad tendrán de ingresar al organismo.

Hay evidencia de que, si el daño primario al DNA no es debidamente reparado puede convertirse en un daño permanente al DNA que puede medirse mediante el aumento en la frecuencia de MN y las otras AN, las células con daño extendido en el DNA (es decir, con inestabilidad genómica) se envían a las vías apoptóticas, lo que se pone de evidencia por el aumento de células cariorrecticas (De Aquino et al., 2016). Las correlaciones ponen en evidencia que hay mayor incidencia de muerte celular por los valores de CX y CL, lo que queda justificado con un daño extendido al DNA por el aumento en las horas laborales dentro de la imprenta.

Por último, se buscó determinar si el hábito de fumar tabaco se veía asociado a un aumento en la incidencia de AN en trabajadores expuestos a COV, lo que significaría un mayor efecto genotóxico en estos individuos. Se sabe que el humo de tabaco contiene numerosos productos químicos genotóxicos, sin embargo se han reportado resultados contradictorios sobre los efectos genotóxicos del tabaquismo. Varios autores han encontrado que la incidencia de MN no se asocia significativamente con el tabaquismo en individuos expuestos ocupacionalmente a derivados del combustible u otras sustancias potencialmente cancerígenas (García et al., 2012) Por otro lado, Çelik y colaboradores [2003] en un biomonitorio dirigido a trabajadores de gasolineras informaron que el consumo de tabaco aumentó significativamente el riesgo de tener una alta frecuencia de células BN pero los individuos en su estudio eran fumadores de un alto número de cigarrillos (20-25 cigarrillos/día) mientras que en este estudio solo se reportó un máximo de 9 o más cigarrillos (sin especificar).

En este caso los resultados coinciden con aquellos que indican que la incidencia de MN no se asocia significativamente con el tabaquismo, así mismo con las demás AN. Lo cual también coincide con lo reportado trabajadores de centrales termoeléctricas (García et al., 2012) y trabajadores de gasolineras (Salem et al., 2018) en donde los valores reportados fueron 2.04 ± 1.33 vs 2.57 ± 1.52 para fumadores y no fumadores respectivamente. Por lo tanto, en este estudio se afirma que la exposición a COV y el tabaquismo no actúan sinérgicamente respecto a un daño genotóxico y citotóxico.

Los MN y las diferentes AN se consideran marcadores de etapas tempranas de enfermedades crónicas como lo es el cáncer, por lo que el aumento en su frecuencia puede ayudar a predecir un desarrollo neoplásico, ahí es donde reside la importancia del biomonitorio (Ferré et al., 2018). Es esencial investigar niveles aceptables de COV, ya que esta área de investigación es vital para tener en cuenta la salud y seguridad de los trabajadores expuestos ocupacionalmente (Kuranchie et al., 2019).

CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó un biomonitorio a trabajadores de una imprenta mediante el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral logrando evaluar si la exposición a compuestos orgánicos volátiles es genotóxica.
- ✓ Se cuantificó la frecuencia de micronúcleos y de núcleos lobulados obteniendo un aumento significativo en la frecuencia de ambas anomalías en el grupo expuesto a COV siendo estos valores evidencia de genotoxicidad.
- ✓ Se cuantificó la frecuencia de células binucleadas obteniendo un aumento significativo en su frecuencia en el grupo expuesto a COV por lo que se consideran evidencia de defectos en la citocinesis.
- ✓ Se cuantificó la frecuencia de cariolisis y cariorrexis obteniendo un aumento significativo en la frecuencia de ambas anomalías en el grupo expuesto a COV siendo estos valores evidencia de inducción de muerte celular.
- ✓ Se relacionaron los resultados obtenidos con las horas laborales de los trabajadores en la imprenta encontrando una relación positiva para cada una de las AN por lo que se confirma que a más horas laborando en la imprenta mayor es la frecuencia de AN.
- ✓ No se encontró diferencia significativa entre el grupo expuesto a COV con el hábito de fumar y el grupo expuesto a COV sin dicho hábito por lo que se concluye que el tabaquismo no actúa sinérgicamente con los daños causados por la exposición a COV.
- ✓ Los resultados son confirmatorios de que la exposición a COV inducen genotoxicidad, muerte celular y defectos en la citocinesis en los trabajadores expuestos.

Perspectivas y recomendaciones

- ✓ Los trabajadores expuestos a COV no utilizaban el equipo de bioseguridad adecuado por lo que se recomienda la difusión de pláticas donde se informe de la importancia del uso de equipo necesario y los cuidados requeridos.
- ✓ La cuantificación de los COV dentro de la imprenta permitiría identificar si las concentraciones de estos son nocivas a la salud y así tomar las medidas necesarias para reducir dichas concentraciones.

REFERENCIAS

- Berkeley Lab. (2019) VOCs and Cancer. Indoor Air Quality. Scientific Findings Resource Bank. Disponible en <https://iaqscience.lbl.gov/voc-cancer>. (Revisado el 16 de Junio de 2019)
- Böcking, A. (sf) Feulgen Staining. Diagnostic DNA-ICM. Disponible en http://www.cytopathologiednaicm.uniduesseldorf.de/methods/feulgen_staining_1.htm (Revisado el 09 de Enero de 2020)
- Bolognesi, C. & Fenech, M. (2013) Micronucleus Assay in Human Cells: Lymphocytes and Buccal Cells. Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Totowa, NJ. Pag 191-207
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P. & Fenech, M. (2013) The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - An update and expanded photogallery. *Mutation Research*, 753, 100-113
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., Da Silva, J., De Andrade, V., Cakmak, G., Domínguez, A., Donmez, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez, B., Gomez, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Grazia, M., Montero, R., Nersesyan, A., Pastor, S., Favero, D., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres, O., Singh, A., Zuñiga, G. & Fenech, M. (2011) The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL):The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728, 88-97
- Camacho, J. (2008) Asociación entre variables cuantitativas: análisis de correlación. *AMC*, 50 (2), 94-96

-
- Catalytic Products (sf) Flexographic Printing and VOC Control. Disponible en <https://www.cpilink.com/flexographic-printing-and-voc-control> (Revisado el 25 de Agosto de 2019)
- Cavallé, N. (2011) Evaluación y control de la exposición laboral a agentes neurotóxicos. Disolventes industriales. INSHT. Barcelona. Disponible en <http://neurologiadeltrabajo.sen.es/pdf/ponencia2011e.pdf>. (Revisado el 18 de Junio de 2019)
- Çelik, A., Çavaş, T. & Ergene-Gözükara, S. (2003) Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells, *Mutagenesis*, 18 (5), 417–421
- Cheong, H., Seth, I., Joiner, M. & Tucker, J. (2013) Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 28 (4), 433-440
- Christofoletti, D., Tamie, S., Emilio, C., de Franceschi, D. & Marin-Morales, M. (2013) Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. *Chemosphere*, 90(3), 1030–1036
- Coava, J. y Tovar, U. (2009) Caracterización de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) por cromatografía de alta velocidad. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. (1917 con reforma 2017). Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación.
- De Aquino, T., Zenkner, F., Ellwanger, J., Prá, D. & Rieger, A. (2016) DNA damage and cytotoxicity in pathology Laboratory technicians exposed to organic solvents. *An Acad Bras Cienc*, 88 (1), 227-236

- De Oliveira, H., Dagostim, G., da Silva, A., Tavares, P., da Rosa, L. & de Andrade, V. (2011) Occupational risk assessment of Paint industry workers. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 15 (2), 52-58.
- DOF (1995) NOM-075-SEMARNAT-1995. Que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles provenientes del proceso de los separadores agua-aceite de las refinerías de petróleo.
- DOF (1999) NOM-123-SEMARNAT-1998. Que establece el contenido máximo permisible de compuestos orgánicos volátiles (COVs), en la fabricación de pinturas de secado al aire base disolvente para uso doméstico y los procedimientos para la determinación del contenido de los mismos en pinturas y recubrimientos.
- DOF (1998) NOM-121-SEMARNAT-1997. Que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles (COVs) provenientes de las operaciones de recubrimiento de carrocerías nuevas en planta de automóviles, unidades de uso múltiple, de pasajeros y utilitarios; carga y camiones ligeros, así como el método para calcular sus emisiones.
- DOF (1996) NOM-048-SSA1-1993, Que establece el método normalizado para la evaluación de riesgos a la salud como consecuencia de agentes ambientales.
- DOF (1999) NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.
- DOF (2000) NOM-018-STPS-2000, Sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.

- DOF (2003) NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-salud, ambiental - Residuos peligrosos biológico - infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- DOF (2009) NOM-030-STPS-2009, Servicios preventivos de seguridad y salud en el trabajo, funciones y actividades.
- DOF (2012) NOM-047-SSA1-2011, Salud ambiental-índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.
- DOF (2014) NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral - Reconocimiento, evaluación y control.
- Dominguez, A., Rojas, E., Romero, L., Rodríguez, J. & Pérez, I. (2005) Lesiones citológicas bucoepiteliales en trabajadores expuestos a productos químicos. *Rev Med IMSS*, 43 (3), 221-227
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A., Surrallés J., Crott J., Parry J., et al. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26, 125-132
- Ferré, D., Quero, M., Hynes, V., Saldeña, E., Lentini, V., Tornello, M., Carracedo, R & Gorla, N. (2018) Ensayo de micronúcleos de citoma bucal en trabajadores de fincas frutícolas que han aplicado plaguicidas alrededor de quince años. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 34 (1), 23-33
- Garcia, P., Linhares, D., Amaral, A. & Rodrigues, A. (2012) Exposure of thermoelectric power-plant workers to volatile organic compounds from fuel oil: Genotoxic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells. *Mutation Research*, 747, 197-201
- Hadad, K, Reza, H y Mokhtari, J. (2017) VOC level control by ventilation improvement of Flexography printing room using CFD modeling. *Journal of Applied and Computational Mechanics*, 3(3), 171-177

- Hayashi, M. (2016) The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environ*, 38 (18), 1-6.
- HealthLinkBC. (2018) Indoor Air Quality: Volatile Organic Compounds (VOCs). British Columbia. Disponible en <https://www.healthlinkbc.ca/healthlinkbc-files/air-quality-VOCs> (Revisado el 16 de Junio de 2019)
- Hernández, S. (2017) Insuficiencia de la regulación de los compuestos orgánicos volátiles en México. SEMARNAT, Disponible en http://www.pincc.unam.mx/7mocongreso/7O_CONGRESO/CCA/MIERCOLES_CCA/MIERCOLES_CCA_PDF/MESA_3/3_SERGIO_HERNANDEZ.pdf. (Revisado el 15 de Junio de 2019)
- IARC (2012F) Chemical agents and related occupations. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 100, 1-628
- Kalsbeek, D. & Golsteyn, R. (2017) G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cells. *Int J Mol Sci*, 18(11), 1-16
- Kashyap, B. & Reddy, P. (2012) Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Can Res Ther*, 8(2), 184-191
- Knudsen, L. & Franco, D. (2012) Biomarkers and Human Biomonitoring. Volume 1: Ongoing Programs and Exposures. RSC Publishing. UK. Pag 1-4
- Kuranchie, F., Angnunavuri, P., Attiogbe, F. & Nerquaye-Tetteh, E. (2019) Occupational exposure of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) to pump attendants in Ghana: Implications for policy guidance. *Cogent Environmental Science*, 5(1), 1-18
- Ley Federal del Trabajo. (1º de abril de 1970, reforma 2015). Ley Federal del Trabajo. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación.

- López, M., Tapia, S., Navarrete, J., Torres, R. & Lizárraga, I. (sf) Manual de identificación de puntos de emisiones Fugitivas y conducidas, al aire, para industrias de Competencia estatal. *Secretaria de desarrollo sustentable*, 204, 2-25
- Luzhna, L., Kathiria, P. & Kovalchuk O. (2013) Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet*, 4 (131), 1-17.
- Martino, M., Viégas, J. & Roth, D. (2003) Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genetics and Molecular Research*, 2 (4), 410-417
- Matheus L., Tibisay, & Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2), 18-26.
- Mello, M. & Vidal, B. (2017) The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochemica*, 119, 603-609
- Metgud, R. & Neelesh, BT. (2018) Effect of staining procedures on the results of micronucleus assay in the exfoliated buccal mucosal cells of smokers and nonsmokers: A pilot study. *J Can Res Ther*, 14(2), 372-376.
- Minhas, S., Kashif, M. & Nagi, A. (2016) Evaluation of Various Nuclear Cytological Changes in Normal Buccal Mucosa and Peritumoural Area in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma Receiving Concomitant Chemoradiotherapy. *Pathology Research International*, 2016, 1-8
- Ministerio para la transición ecológica. (2010) De compuestos orgánicos volátiles. Gobierno de España. Disponible en https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/act-emis/compuestos_organicos_volatiles.aspx (Revisado el 15 de Junio de 2019)

- Oliveira, L., Parreiras, J., Sebastião, E. & Silva, G. (2019). Increase of binucleated cells in the oral mucosa: a study on the use of psychotropics by students of a Brazilian institution. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 65 (6), 870-879.
- Pablos, G. (2015) La lista de elementos cancerígenos según la OMS. EL MUNDO. Disponible en <https://www.elmundo.es/grafico/salud/2015/10/30/5633c8cb22601da2218b458d.html> (Revisado el 9 de Enero de 2020)
- Ranjan, M., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S. & Lahiri, T. (2005) Micronucleus Frequencies and Nuclear Anomalies in Exfoliated Buccal Epithelial Cells of Firefighters. *Int J Hum Genet*, 5(1), 45-48
- Salem, E., El-Garawani, I., Allam, H., El-ALL, B. & Hegazy, M. (2018) Genotoxic effects of occupational exposure to benzene in gasoline station workers. *Industrial Health*, 56, 132-140
- Singh, B., McKinney, R. & Kolas, S. (1975) Histochemistry of the keratohyalin granules in human oral leukoplakia. *J. Oral. Pathol*, 4 (2), 59-66.
- Singh, M., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A., Mudiam, M., Patel, D., Ravi, K & Kar, D. (2011) Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: Attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(1), 14-30.
- Stich, H., Curtis, J. & Parida, B. (1982) Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer* 30(5), 553-559
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A., Benbrahim-Tallaa, L. & Coglianò, V. (2008) Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *The Lancet Oncology*, 8, 1065-1066
- Tang, T., Gminski, R., Könczöl, M., Modest, C., Armbruster, B. & Mersch-Sundermann, V. (2012) Investigations on Cytotoxic and Genotoxic

- Effects of Laser Printer Emissions in Human Epithelial A549 Lung Cells Using an Air/Liquid Exposure System. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53, 125-135
- 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(6), 825-837
- Van de Kant, K., van der Sande, L., Jöbsis, Q., van Schayck, O. & Dompeling, E. (2012) Clinical use of exhaled volatile organic compounds in pulmonary diseases: a systematic review. *Respiratory Research*, 13(117), 1-23.
- Villalba, M., Ramírez, S., Sánchez, M., Rondón, M., Ibáñez, M., Marien, R., Varona, M. & Chuaire, L. (2016) Quantification of cell-free DNA for evaluating genotoxic damage from occupational exposure to car paints. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 11(33), 2-9.
- Wang, F., Li, C., Liu, W. & Jin, Y. (2013) Oxidative damage and genotoxic effect in mice caused by sub-chronic exposure to low-dose volatile organic compounds. *Inhalation Toxicology.*, 25 (5), 235-242
- Waqas, M. (2016) What is industrial printing? Use of technology. Disponible en <https://www.useoftechnology.com/online-industrial-printing-benefit/> (Revisado el 18 de Agosto de 2019)
- Yadav, A. & Jaggi. S. (2015) Buccal Micronucleus Cytome Assay- A Biomarker of Genotoxicity. *J Mol Biomark Diagn*, 6(3), 2-6.

ANEXOS

Anexo I. Carta de consentimiento informado para participación en el protocolo de

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	
Fecha: ____/____/____	
Nombre del estudio:	Efectos cito y genotóxicos en trabajadores de una imprenta expuestos a compuestos orgánicos volátiles.
Lugar y fecha:	Ciudad de México, año 2019
Objetivo y justificación y del estudio:	Identificar si existen cambios a nivel celular y genético en trabajadores que se exponen a compuestos orgánicos volátiles, para poder tomar medidas preventivas antes de que se desarrolle alguna enfermedad clínicamente establecida.
Procedimientos:	Prueba de micronúcleos en mucosa oral; biometría hemática en sangre periférica; PCR (Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real) para marcadores de estrés oxidativo y proteínas de choque térmico. Se realizará en una sola sesión, con un tiempo aproximado de 15 a 20 minutos junto con la toma de muestra biológica y sus datos personales de la encuesta sociolaboral.
Posibles riesgos y molestias:	Punción venosa: dolor en el sitio de punción, hematomas, lesión al nervio dentro del paquete neurovascular en el sitio de punción. Muestra de carrillos internos de la boca: es una muestra no invasiva, puede percibir sabor desagradable o sensación de sequedad transitoria por el aplicador de madera estéril. Cualquier tratamiento para aliviar molestias correrá por cuenta del investigador.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Pruebas especiales sin costo alguno; además de contribuir a la investigación en materia de salud ocupacional para la vigilancia a la salud; identificación oportuna de algún padecimiento, aunque no presente síntomas.
Participación o retiro:	Usted tiene la libertad de participar o negarse libremente.
Privacidad y confidencialidad:	Todos los datos que usted proporcione se manejan de forma confidencial, sin ser utilizada con otros fines ajenos al estudio.
Investigador Responsable:	Brenda Ivonn Rodríguez Romero
Correo electrónico:	brodriguezr1803@alumno.ipn.mx
Teléfono móvil:	55 8146 6416
_____ Nombre y firma del participante	_____ Nombre y firma del investigador responsable
_____ Nombre y firma del testigo 1	_____ Nombre y firma del testigo 2

Anexo II. Encuesta realizada a los trabajadores de la imprenta



Proyecto de investigación

Instituto Politécnico Nacional

Maestría en Ciencias en Salud Ocupacional, Seguridad e Higiene



Encuesta socio laboral

Folio:

Fecha de aplicación: / /

Responsable: Dra. Brenda Rodríguez / Dr. Abraham Cerón Alonso

Agradecemos poder contar con su participación. Responda las siguientes preguntas anotando en los espacios libres y rellenando el círculo de una de las opciones proporcionadas, según sea el caso. Ante cualquier duda, acérquese con nosotros.

DATOS PERSONALES DEL TRABAJADOR

1. Nombre completo:

2. Fecha de nacimiento: Día _____ Mes _____ Año _____

3. ¿Cuál es su sexo?

- Hombre
 Mujer

4. ¿Cuál es su puesto de trabajo?

- Recepción
 Tintas
 Montaje
 Impresión
 Laminado
 Refinado
 Bolseo
 Merma
 Embarque
 Otro, especifique: _____

5. ¿Cuál es su turno de trabajo?

- Matutino
 Vespertino
 Nocturno

6. ¿Cuál es su horario?

Hora de entrada: _____ hrs

Hora de salida: _____ hrs

7. ¿Rolas turnos?

- No
 Sí, ¿qué turno? (de ser necesario, marca más de 1 opción)
 Matutino Vespertino Nocturno



Proyecto de investigación

Instituto Politécnico Nacional

Maestría en Ciencias en Salud Ocupacional, Seguridad e Higiene



8. Marque con una X los días a la semana que labora:

 Domingo Lunes Martes Miércoles Jueves Viernes Sábado

9. Marque con una X los días a la semana que descansa:

 Domingo Lunes Martes Miércoles Jueves Viernes Sábado

10. ¿Realiza horas extra?

 No Sí, ¿cuántas horas a la semana? _____ hrs

11. ¿Cuándo fue su último periodo vacacional? Número de días: _____ Mes _____ Año _____

12. ¿Cuál es su antigüedad en este puesto de trabajo? _____ años y _____ meses

13. ¿Tiene otro trabajo además de este?

 No Sí, especifique:

¿Qué trabajo realiza? _____

¿Desde hace cuánto tiempo? _____

¿Cuántas horas al día? _____ y cuantos días a la semana? _____

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS Y NO PATOLÓGICOS

14. ¿Es alérgico a algún medicamento, alimento, etc.?

 No Sí, especifique a qué es alérgico: _____

15. ¿Cuántas comidas hace al día?

 1 al día 2 al día 3 Más de 3 al día

16. ¿Usted toma?

 No Sí, una vez a la semana Sí, 2-3 veces a la semana Sí, más de 3 veces a la semana

17. Realiza algún tipo de ejercicio

 No Si, ¿qué ejercicio realiza?

¿Cuántos días a la semana? _____ y cuantas horas al día _____ hrs



Proyecto de investigación

Instituto Politécnico Nacional

Maestría en Ciencias en Salud Ocupacional, Seguridad e Higiene



18. ¿Usted fuma?
- No
 - Sí, 1 vez a la semana
 - 1 cigarrillo
 - 2-3 cigarrillos
 - >3 cigarrillos
 - Sí, 2-3 veces a la semana
 - 1 cigarrillo
 - 2-3 cigarrillos
 - >3 cigarrillos
 - Sí, más de 3 veces a la semana
 - 1 cigarrillo
 - 2-3 cigarrillos
 - >3 cigarrillos
19. ¿Te has pintado o decolorado el cabello en los últimos 3 meses?
- No
 - Sí, decolorado
 - Sí, pintado
 - Sí, pintado y decolorado
20. ¿Actualmente consume algún medicamento?
- No
 - Sí, vitaminas, suplemento alimenticio
 - Sí, otro, especifique: _____
21. ¿Tiene alguna enfermedad?
- No
 - Sí, especifique cuál:
 - Anemia
 - Problemas de la circulación (trombosis, varices)
 - Hipertensión
 - Diabetes
 - Colesterol y/o triglicéridos altos
 - Problemas de coagulación (sangrado de nariz, moretones sin razón)
 - Otra: _____
22. ¿Ha presentado algún tumor o cáncer en alguna parte de su cuerpo?
- No
 - Sí, especifique el tipo y la parte de su cuerpo: _____
23. ¿Ha tenido alguna molestia durante el desarrollo de su trabajo?
- No
 - Sí, especifique (puede seleccionar más de una de las siguientes):



Proyecto de investigación

Instituto Politécnico Nacional

Maestría en Ciencias en Salud Ocupacional, Seguridad e Higiene



- Mareo
- Náusea
- Sensación de cansancio
- Pérdida de memoria
- Sensación de realizar sus actividades más lentamente
- Pérdida de cabello
- Moretones sin causa aparente
- Sangrado de encías, nariz
- Sangrado prolongado o retraso en la cicatrización ante lesiones
- Irritación ocular y/o lagrimeo
- Irritación en boca y garganta
- Irritación en vías urinarias
- Dolor de cabeza
- Otro, especifique: _____

24. Actualmente, ¿tiene alguna molestia?

- No
- Sí, especifique cuál: _____

25. De ser mujer, utiliza algún método anticonceptivo (para no embarazarse):

- No
- DIU de cobre (tradicional)
- Hormonales: pastillas, implante, inyecciones o DIU con hormona

26. De los siguientes síntomas, marque con una X el grado experimentado durante los últimos 3 meses de acuerdo con el semáforo presentado.

1 Nunca	2 Casi nunca	3 Pocas veces	4 Algunas veces	5 Relativamente frecuente	6 Muy frecuente
------------	-----------------	------------------	--------------------	------------------------------	--------------------

SÍNTOMAS	1	2	3	4	5	6
Imposibilidad de conciliar el sueño						
Dolor de cabeza						
Indigestión o molestia gastro-intestinal						
Sensación de cansancio extremo o agotamiento						
Tendencia de comer, beber o fumar más de lo habitual						
Disminución del interés sexual						
Respiración entrecortada o sensación de ahogo						
Disminución del apetito						
Temblor muscular (tic nervioso, parpadeos)						
Pinchazos o sensaciones dolorosas en distintas partes del cuerpo						
Sin ganas de levantarse por la mañana						
Tendencia a sudar o palpitaciones						



Proyecto de investigación
Instituto Politécnico Nacional
Maestría en Ciencias en Salud Ocupacional, Seguridad e Higiene



27. Marque con una X el nivel del 1 a 10 en cada uno de los ÍTEMS de acuerdo a la sensación que perciba en cada DIMENSIÓN; siendo 1 si no presenta sensación y 10 el máximo.

DIMENSIONES	ÍTEMS	Poco								Mucho			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
FALTA DE ENERGÍA	Agotado												
	Exhausto												
	Extenuado												
CANSANCIO FÍSICO	Respirando con dificultad												
	Palpitaciones												
	Con calor												
DISCONFORT FÍSICO	Con las articulaciones agarrotadas												
	Entumecido												
	Dolorido												
FALTA DE MOTIVACIÓN	Apático												
	Pasivo												
	Indiferente												
SOMNOLENCIA	Somnoliento												
	Durmiéndome												
	Bostezante												
IRRITABILIDAD	Irritable												
	Enojado												
	Furioso												

Le agradecemos mucho su participación en este proyecto. Una vez obtenidos los resultados, se los daremos a conocer a través de su jefe inmediato.