



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**MONITOREO DE LA GENOTOXICIDAD EN EL  
PERSONAL DE ENFERMERÍA, EXPUESTO A  
QUIMIOTERAPÉUTICOS MEDIANTE EL ENSAYO  
DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA  
CITOCINESIS**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**BRISEÑO GÓMEZ CYNTHIA ANAYELLI**

**DIRECTORA DE TESIS: [DRA. ELIA ROLDÁN REYES](#)**

**ASESORA: [DRA. LILIA ALICIA ALCANTAR ZAVALA](#)**



México D.F.

Marzo, 2016



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.

Esta tesis se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, en el laboratorio 2 (planta alta) de **Citogenética y Mutagénesis**, que es parte de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), bajo la dirección de la ***Dra. Elia Roldán Reyes***.

Financiamiento: **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Coordinación de la Investigación Científica. Se contó con Beca-Tesis.**

**UNAM -PAPIIT IN213013-3.**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **BRISEÑO GÓMEZ CYNTHIA ANAYELLI**, con número de cuenta **305097017**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **01 de marzo de 2016** a las **17:00 h.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

**VOCAL** Dra. ELIA ROLDÁN REYES

**SECRETARIO** Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

*Alvarez Barrera Lucila*

**SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

**SUPLENTE** M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Monitoreo de la genotoxicidad en el personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 07 de enero de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA  
DIRECCIÓN

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

# *Agradecimientos*

*A mis padres, **José y Rosa** por siempre brindarme su apoyo incondicional.*

*A mi hermana **Carmen**, por apoyarme cuando lo necesitaba y brindarme su ayuda.*

*A mi novio **Angel**, por siempre impulsarme a seguir luchando, porque nunca dejaste que me diera por vencida y por recorrer el camino de la Biología juntos.*

*A la **Dra. Elia**, por permitirme formar parte del laboratorio, por sus consejos y regaños, que sin duda generaron buenas raíces, en mí trayecto hacia la investigación. Gracias por compartir toda su sabiduría conmigo, no solo científica sino personal.*

*A la **Dra. Lili**, por su confianza y apoyo para realizar este trabajo.*

*A mis amigos de carrera, **Yamile, Carlos, Paty, Ibeth, Héctor**, por brindarme su amistad. Por las incontables risas y anécdotas tanto en la facultad como en las prácticas de campo.*

*A mis amigos de laboratorio, **Héctor y Jorge**, por hacer el trabajo de laboratorio más sencillo.*

*A mi hermano **Jonathan**, por su apoyo en actividades extracurriculares (invernadero). Te quiero mucho y ojalá te sirva de ejemplo, para que llegues a vivir la maravillosa experiencia de la universidad, en la mayor casa de estudios, UNAM.*

*A la **Sra. Esperanza**, por su apoyo gastronómico.*

## ***Dedicatoria***

***A mis padres José Briseño y Rosa Gómez, que han sido los cimientos fundamentales de mi educación, sembraron en mí, las bases de responsabilidad y deseos de superación.***

***Gracias por su amor, esfuerzo, constancia, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada esta meta.***

***Gracias por brindarme su apoyo incondicional, los amo infinitamente.***

***Papá, mamá y hermana, gracias por brindarme la calidez de una familia, que a pesar de las diferencias siempre está unida.***

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
RESUMEN.....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Exposición laboral.....	1
1.2 Agentes quimioterapéuticos.....	2
1.2.1 Agentes Alquilantes.....	4
1.2.2 Antimetabolitos.....	5
1.2.3 Inhibidores mitóticos.....	5
1.2.4 Inhibidores de la topoisomerasa II.....	5
1.3 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.....	5
1.3.1 Citocalasina- <i>B</i> .....	7
1.4 Micronúcleos.....	7
1.5 Puentes nucleoplásmicos.....	11
1.6 Yemas nucleares.....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....</b>	<b>16</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>16</b>
5.1 Criterio de inclusión y exclusión.....	17
5.2 Tamaño de muestra.....	17
5.3 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.....	18
5.4 Análisis estadístico.....	19
<b>6. RESULTADOS DE GENOTOXICIDAD.....</b>	<b>20</b>
6.1 Genotoxicidad en células mononucleadas.....	21
6.2 Genotoxicidad en células binucleadas.....	22
<b>7. ANÁLISIS DE RESULTADOS GENOTOXICIDAD.....</b>	<b>24</b>
7.1 Genotoxicidad en células mononucleadas.....	25
7.2 Genotoxicidad en células binucleadas.....	26
<b>8. RESULTADOS DE CITOSTATICIDAD.....</b>	<b>30</b>

...

<b>8.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS CITOSTATICIDAD.....</b>	<b>33</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>35</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>12. ANEXOS</b>	
<b>I Preparación de reactivos para el ensayo de MNBC.....</b>	<b>39</b>
<b>II Consentimiento informado, personal no expuesto a quimioterapéuticos.....</b>	<b>40</b>
<b>III Consentimiento informado, personal expuesto a quimioterapéuticos.....</b>	<b>43</b>
<b>IV Cuestionario aplicado a las enfermeras que manipulan quimioterapéuticos...</b>	<b>46</b>
<b>V Participación académica.....</b>	<b>48</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**BN:** Binucleada.

**Cit-B:** Citocalasina B.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**E.E.:** Error estándar.

**IDN:** Índice de división nuclear

**MN:** Micronúcleo

**MNBC:** Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

**PN:** Puente nucleoplásmico.

**YN:** Yema nuclear.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Formación de MN y PN en células sometidas a división nuclear (Fenech *et al.*, 2011).

**Figura 2.** Mecanismos de formación de micronúcleos (Terradas *et al.*, 2010).

**Figura 3.** Formación de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos (Fenech *et al.*, 2011).

**Figura 4.** Modelo de formación de un micronúcleo y yemas nucleares (Lindberg., *et al.*, 2007).

**Figura 5.** Genotoxicidad en células mononucleadas.

**Figura 6.** Microfotografías de linfocitos con bloqueo de la citocinesis, en células mononucleadas, MN y YN.

**Figura 7.** Genotoxicidad en células binucleadas.

**Figura 8.** Microfotografías de linfocitos con bloqueo de la citocinesis, en células binucleadas MN, PN y YN.

**Figura 9.** Índice de división nuclear (IDN).

**Figura 10.** Cinética de división nuclear.

**Figura 11.** Microfotografías de células linfocíticas polinucleadas.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Clasificación de los agentes quimioterapéuticos (Witt y Bishop, 1996; Frías, 2002).

**Tabla 2.** Características sociodemográficas de la muestra estudiada.

**Tabla 3.** Genotoxicidad en células mononucleadas y células binucleadas. Micronúcleos (MN), puente nucleoplásmicos (PN) y yemas nucleares (YN), en personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos.

**Tabla 4.** Índice de División Nuclear (IDN), células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas en cultivo de linfocitos humanos, de personal de enfermería expuesto laboralmente a quimioterapéuticos.

## RESUMEN

Existen factores capaces de influir en la integridad cromosómica son estilo de vida, tratamientos médicos y ocupación laboral. Los agentes quimioterapéuticos son un grupo de fármacos utilizados en el tratamiento contra el cáncer, causan daños irreparables en células malignas y sanas. El personal de enfermería está expuesto a los quimioterapéuticos por ingestión, inhalación y absorción cutánea; considerados factores de riesgo genotóxico. El ensayo *in vitro* de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC) en linfocitos humanos, es universalmente validado y eficiente para evaluar daño al ADN e inestabilidad genética inducida por agentes químicos y físicos. Los Micronúcleos (MN) y otras anomalías nucleares, tales como puentes nucleoplásmicos (PN) y yemas nucleares (YN) son biomarcadores de exposición a genotóxicos que representan inestabilidad cromosómica. Así como estimar el efecto citostático (inhibir el crecimiento y multiplicación celular) de los agentes quimioterapéuticos mediante el índice de división nuclear (IDN). El objetivo del trabajo fue evaluar el daño genotóxico y citostático mediante el ensayo de MNBC en personal de enfermería expuesto laboralmente a quimioterapéuticos. El estudio es de tipo descriptivo, transversal y observacional, constituido por 175 enfermeras(os) del estado de Michoacán. Se analizaron 1000 células mononucleadas y 1000 binucleadas por individuo en microscopio de campo claro (40 y 100X), se registraron las frecuencias de MN, PN y YN, así como células mononucleadas y polinucleadas. Resultados: se observó daño nuclear heterogéneo provocado por los agentes quimioterapéuticos, la media de MN en células **mononucleadas** ( $3.9 \pm 0.36^*$  **VS**  $1.6 \pm 0.16$ ) y YN ( $8.0 \pm 0.88^{**}$  **VS**  $1.4 \pm 0.24$ ) se incrementaron de manera significativa ( $p < 0.005^*$ ) en comparación con el grupo control. La media en células **binucleadas** de MN ( $5.3 \pm 0.46^{**}$  **VS**  $3.1 \pm 0.25$ ), en PN ( $4.9 \pm 0.78^*$  **VS**  $2.7 \pm 0.30$ ) y YN ( $3.6 \pm 0.35^*$  **VS**  $1.4 \pm 0.15$ ) mostraron un incremento el cual fue significativo ( $p < 0.005^*$  y  $0.0005^{**}$ ) en comparación con el grupo control validados con la prueba *t*-Student. El **Índice de división nuclear (IDN)** en cultivo de linfocitos humanos de personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos, no resulta ser estadísticamente significativo. Las anomalías nucleares mostradas en este estudio son indicativos de daño al genoma y su presencia aumenta el riesgo de padecer enfermedades cronicodegenerativas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hay un esfuerzo cada vez mayor en todo el mundo para determinar el impacto de los factores ambientales y estilo de vida en la estabilidad genómica de las poblaciones humanas (**Fenech *et al.*, 1999**). La integridad genética está cada vez más amenazada, por las actividades industriales derivadas de la liberación y la exposición a genotoxinas químicas y físicas. Además, el daño genómico puede ser causado por la exposición ambiental a genotoxinas, varias terapias médicas (radiación y químicos), la deficiencia de micronutrientes (ácido fólico), los factores de estilo de vida (estrés, alcohol, tabaco, y drogas), los cambios climáticos (aumento de la exposición a la radiación ultravioleta debido al agotamiento de la capa de ozono) y factores genéticos (defectos hereditarios en el metabolismo y/o la reparación del ADN) (**Nefic y Handzic, 2013**).

La integridad genética de la población humana se encuentra comprometida por los factores mencionados anteriormente; por lo que es importante determinar ¿Qué se conoce como un nivel “aceptable” de daño genético?, realizar ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria y monitorear aquellos individuos que, por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones capaces de modificar su estabilidad genética (**Zalacain *et al.*, 2005**).

### 1.1. Exposición laboral.

El efecto mutagénico y carcinogénico de agentes genotóxicos en las poblaciones humanas que están expuestos ocupacionalmente, ha sido una preocupación creciente. En una rutina hospitalaria, se utilizan varios agentes mutagénicos, ya sea para el mantenimiento, el diagnóstico y tratamiento del paciente. Para los pacientes, los beneficios son evidentes. Sin embargo, para los profesionales que están continuamente expuestos a estos agentes, los riesgos deben ser evaluados con el fin de establecer una gestión adecuada, debido a que los trabajadores manipulan, preparan, y/o administran fármacos antineoplásicos.

Waksvik *et al.* 2000 y Nikula *et al.*, (cita en Weidner y Erdtmann, 2000), reportaron un incremento significativo de aberraciones cromosómicas estructurales en los linfocitos de enfermeras que manejan fármacos antineoplásicos y un aumento en la frecuencia de

intercambio de cromátidas hermanas. Machado-Santelli *et al.* (cita en Weidner y Erdtmann, 2000), observó un incremento de células micronucleadas en la cavidad oral de enfermeras que manipulan fármacos antineoplásicos **(Weidner y Erdtmann, 2000)**.

El riesgo ocupacional por la exposición citotóxica está presente en todas las actividades que involucran el manejo de estos medicamentos. Los riesgos para el personal que labora en el área de manipulación de medicamentos antineoplásicos provienen de una combinación de su toxicidad inherente y de la extensión de la exposición. La contaminación puede producirse por la inhalación de partículas del medicamento o por contacto directo con la piel y mucosas. La preparación y administración de mezclas intravenosas de quimioterapéuticos, así como la eliminación de los desechos generados en estos procesos, plantea como principal inconveniente, los riesgos ocupacionales a los cuales podrían estar expuestos los trabajadores que laboran en esta importante actividad, producto de las propiedades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas exhibidas por estos compuestos, por lo tanto es de vital importancia que durante todas las etapas se siga el conjunto de normativas establecidas para el adecuado manejo de estos medicamentos, por ejemplo: utilizar cubrebocas, guantes, gafas, bata y gorro **(Rodríguez *et al.*, 2004)**.

El personal de enfermería está expuesto a los antineoplásicos por ingestión, inhalación y absorción cutánea, por contacto directo con fómites contaminados, secreciones y excretas. Existe una gran preocupación por los riesgos profesionales a los que se encuentra expuesto el personal de enfermería en contacto con agentes quimioterapéuticos, por ello es preciso la realización de estudios epidemiológicos que incluyan aspectos relacionados con su salud en general y en particular la reproductiva **(Sorsa *et al.*, 2006)**.

## **1.2. Agentes quimioterapéuticos.**

Los **Agentes quimioterapéuticos** son un grupo amplio de fármacos utilizados en el tratamiento contra el cáncer, destacan aquellos capaces de interactuar con el ADN y/o sus precursores, los que inhiben su síntesis y causan daños irreparables en células malignas y sanas **(Martínez *et al.*, 2002)**. Actualmente existe una gran cantidad de agentes químicos que se usan contra el cáncer, todos ellos son citotóxicos y no tienen un blanco celular

específico. Se clasifican de acuerdo a su actividad sobre las macromoléculas celulares en: agentes alquilantes por ejemplo **Ifosfamida**, antimetabolitos como **Methotrexate**, inhibidores del huso mitótico como la **Vincristina**, inhibidores de la topoisomerasa II por ejemplo Adriamicina y antibióticos como la **Doxorrubicina** (Tabla 1) (Frías, 2002).

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS**

GRUPO	MECANISMO DE ACCIÓN	EJEMPLOS DE SUSTANCIAS
<b>AGENTES ALQUILANTES</b> Particularmente las mostazas, están entre los mutágenos más potentes de células germinales, induciendo letalidad dominante, translocaciones hereditarias (recíprocos).	Introducen grupos alquilo entre las dos hebras de ADN.	<b>Ciclofosfamida, Ifosfamida</b> , Mostaza nitrogenada, Mitomicina C, Procarbazina.
<b>ANTIMETABOLITOS</b> Estos compuestos son análogos de base y, como tal, requieren un período de síntesis de ADN con el fin de producir un efecto.	Inhiben competitivamente moléculas que intervienen en las vías sintéticas del ADN.	<b>Methotrexate</b> , 5-Fluorouracilo Tioguaninas, Fludarabina
<b>INHIBIDORES MITÓTICOS</b> Estos productos químicos tienden a producir aneuploidia (la ganancia o pérdida de cromosomas completos).	Interfieren con los microtúbulos del huso mitótico.	<b>Vincristina, Vinblastina</b> , Vindesina, Taxanes
<b>INHIBIDORES DE LA TOPOISOIMERASA II</b> En estudios con roedores, se ha demostrado que perjudican la fertilidad de machos y hembras, pero estos efectos se han atribuido a la citotoxicidad en lugar de genotoxicidad.	Interfieren con la actividad de la topoisomerasa II y forman complejos estables ADN-enzima.	Adriamicina, <b>Doxorrubicina</b> .
<b>COMPLEJOS DE PLATINO</b>		Carboplatino, Cisplatino, Oxaliplatino

En verde se encuentran las sustancias manipuladas por enfermeras (os) (Witt y Bishop, 1996; Frías, 2002).

Los mecanismos directos por el cual los quimioterapéuticos pueden causar aberraciones cromosómicas estructurales o cambios numéricos cromosómicos incluyen principalmente la formación de pequeños o voluminosos aductos, enlaces cruzados en la cadena de ADN, y rompimiento de las cadenas de ADN. Los mecanismos indirectos incluyen la inhibición de la reparación del ADN, el deterioro de la segregación de cromosomas, la interrupción de los

puestos de control mitótico, la inhibición de la apoptosis, la perturbación de la citocinesis, la inhibición de las enzimas que participan en el mantenimiento de la metilación del ADN, y la inducción de la inflamación y/o disfunción mitocondrial conduce a el aumento del estrés oxidativo **(Kirsch *et al.*, 2014)**.

Los quimioterapéuticos son un grupo de medicamentos ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer y, en menor medida, de otras enfermedades no oncológicas. Según sus mecanismos de acción, se dividen en varias categorías farmacológicas como son: agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, antibióticos citotóxicos, hormonas y antihormonas, modificadores de la respuesta biológica, así como agentes misceláneos. La mayoría de estos agentes, de forma general, interactúan en gran medida con el ADN o sus precursores e inhiben la síntesis del nuevo material genético o causan daños irreparables sobre este. Durante el tratamiento con estos fármacos, las células no tumorales pueden ser también dañadas por el modo de acción no selectivo de muchos de estos compuestos. Los efectos adversos más comúnmente observados en pacientes tratados son la alopecia, diarreas, vómitos, irritación de las membranas y otros efectos más severos que pueden ocurrir sobre órganos como la médula ósea (leucopenia, trombocitopenia, anemia), hígado, riñones y pulmón. Además de los efectos adversos, los quimioterapéuticos han demostrado poseer otros efectos tóxicos como son la carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad, por lo que el personal que manipula estos compuestos puede enfrentar considerables riesgos para su salud **(Rodríguez *et al.*, 2004)**.

**1.2.1. Agentes alquilantes:** La amplia categoría de alquilación de los productos químicos puede subdividirse en varios grupos, entre ellos las mostazas de nitrógeno, los productos químicos a base de platino, las nitrosoureas y otros alquilantes. Los agentes alquilantes, en particular las mostazas, están entre los más potentes mutágenos de células germinales, induciendo letalidad dominante, translocaciones heredables (recíprocos) y mutaciones específicas del locus. Los medicamentos contra el cáncer (melfalán,



mitomicina C, procarbazona) han demostrado inducir mutaciones específicas del locus en las células madre de espermatogonias (**Witt y Bishop, 1996**).

**1.2.2. Antimetabolitos:** Estos compuestos son análogos de base y, como tal requieren un período de síntesis de ADN con el fin de producir un efecto. Las etapas celulares sensibles son aquellas con una división rápida, tales como las espermatogonias. Las células madre, que requieren una división más lenta tienen mayor oportunidad para la reparación del ADN, y por lo tanto parecen ser menos sensibles a los efectos de estos agentes (**Witt y Bishop, 1996**).

**1.2.3. Inhibidores mitóticos:** Estos productos químicos actúan principalmente a través de la interferencia con el aparato del huso necesario para el proceso de la segregación cromosómica y división celular. Ellos pueden actuar a través de mecanismos incluyendo la disociación de los microtúbulos, inhibición de la polimerización y / o ensamblaje de los microtúbulos, o a través de la estabilización de los microtúbulos, previniendo así el desmontaje del huso mitótico. Estos productos químicos tienden a producir aneuploidia (la ganancia o pérdida de cromosomas enteros) en lugar de la rotura de cromosomas o mutación del gen (**Witt y Bishop, 1996**).

**1.2.4. Inhibidores de la topoisomerasa II:** La toxicidad de la topoisomerasa II ha sido resumido brevemente por Anderson y Berger (1994). Señalaron que, en estudios con roedores, se afecta la fertilidad de ambos (machos y hembras) por lo cual se le atribuye un efecto citotóxico (**Witt y Bishop, 1996**).

### **1.3. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC)**

En las últimas décadas, los enfoques basados en biomarcadores se han aplicado en la evaluación de la exposición de agentes genotóxicos, y los incrementos de estos biomarcadores se consideran los primeros eventos asociados a los cambios relacionados con alguna enfermedad degenerativa. Suponiendo que los mecanismos para la inducción de

daño cromosómico son similares en diferentes tejidos, la extensión del daño cromosómico evaluado en los linfocitos y otros tejidos de sustitución, probablemente reflejen un nivel de daño, en los tejidos propensos al cáncer **(Bonassi et al., 2011)**.

Un biomarcador efectivo de las enfermedades y procesos asociados a la inducción de daño en el ADN es el análisis de Micronúcleos **(Fenech et al., 1999)**.

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos **(Zalacain et al., 2005)**. La inducción de MN se considera como un biomarcador efectivo de las enfermedades y procesos asociados a la inducción de daño en el ADN **(Fenech et al., 1999)**.

El estudio del daño al ADN a nivel de cromosomas, es una parte esencial de la genética toxicológica porque la mutación cromosómica es un evento importante en la carcinogénesis. El ensayo de micronúcleos se ha convertido en uno de los métodos preferidos para la evaluación de daño a los cromosomas, ya que permiten valorar con fidelidad tanto la pérdida de cromosomas y la rotura de cromosomas. En su forma básica el Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC) proporciona criterios morfológicos simples, pero, que son de gran importancia para obtener las siguientes medidas: genotoxicidad (rotura de cromosomas, pérdida de cromosomas, reordenamiento de cromosoma) citotoxicidad (necrosis y apoptosis), citostaticidad (inhibición de la división celular) **(Fenech, 2000)**.

El desarrollo del ensayo MNBC permite una medición más precisa en los linfocitos y más recientemente en células exfoliadas. El ensayo MNBC proporciona una visión más profunda de los mecanismos moleculares que contribuyen en el daño al genoma, que podrían aumentar el riesgo de enfermedades degenerativas. Los micronúcleos (MN), Puentes Nucleoplásmicos (PN) y Yemas Nucleares (YN) proporcionan medidas válidas de daño genético tal como: roturas en el ADN, reparación incorrecta de telómeros, disfunción telomérica, falta de los telómeros, así como la separación defectuosa de cromátidas

hermanas en anafase debido a un fallo de decatenación, la amplificación del ADN y la formación de complejos de reparación del ADN (**Bonassi et al., 2011**).

El ensayo de micronúcleos se basa en la utilización de un agente químico, denominado Citocalasina-B capaz de impedir la citocinesis permitiendo la división nuclear proporcionando a las células un aspecto de células binucleadas mono divididas (**Zalacain et al., 2005**). El bloqueo de la citocinesis con Citocalasina-B detiene la división del citoplasma o citocinesis sin inhibir división nuclear (**Fenech et al., 1999**).

### **1.3.1. La Citocalasina-B**

Es una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas y que han sufrido una sola división (**Zalacain et al., 2005**).

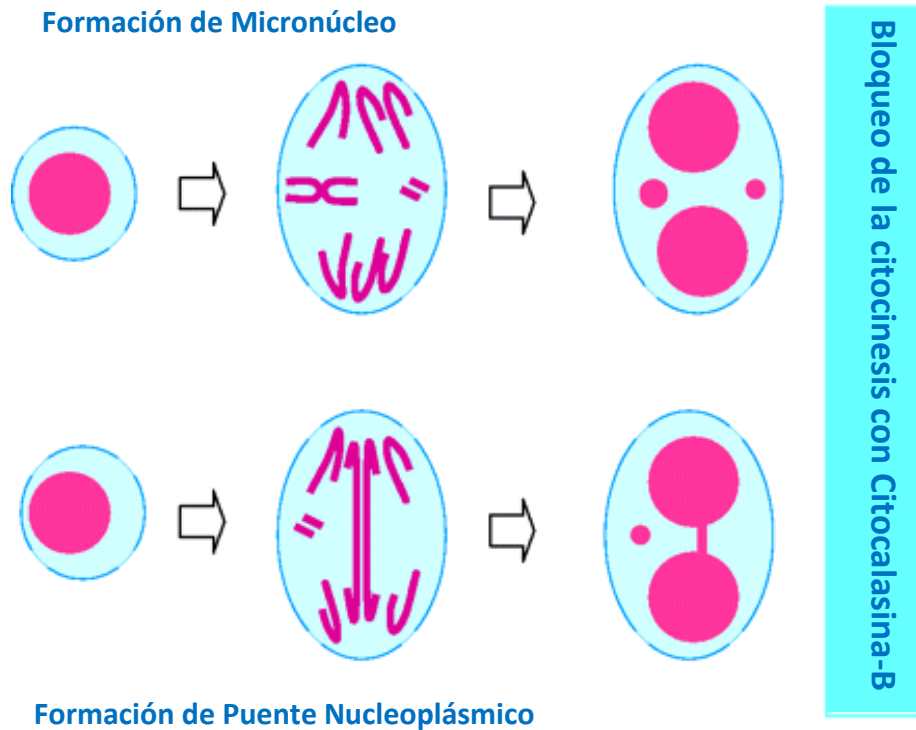
La actina es una proteína citoesquelética la cual polimeriza para formar filamentos. Los filamentos de actina proporcionan soporte mecánico, determinan la forma celular, permiten el movimiento de la superficie celular (esto posibilita a las células a migrar, engullir partículas y dividirse). Tras la mitosis, un anillo contráctil, formado por filamentos de actina y miosina II, se ensambla debajo de la membrana plasmática, al contraerse tira progresivamente de la membrana plasmática hacia adentro, estrangulando la célula por el centro y dividiéndola en dos (los filamentos de actina se desensamblan a medida que avanza la contracción) (**Cooper y Housman, 2002**).

### **1.4. Micronúcleos**

Está bien establecido que los Micronúcleos (MN) se originan principalmente de fragmentos de cromosomas acéntricos o cromosomas enteros que no pueden ser incluidos en los núcleos hijos al final de la telofase durante la mitosis, porque no se adhieren correctamente

con el eje durante el proceso de segregación en anafase. Estos cromosomas desplazados o fragmentos de cromosoma son eventualmente rodeados por una membrana nuclear y, a excepción de su tamaño más pequeño, son morfológicamente similares a los núcleos principales después de la tinción nuclear convencional (**Fenech et al., 2011**).

Los Micronúcleos (MN) en células de mamífero se originan a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros durante anafase en la mitosis o la meiosis. Es importante señalar que, durante la meiosis, hay dos etapas anafase, durante el cual el material cromosómico es segregado. Durante anafase I, uno de los cromosomas homólogos, con dos cromátidas unidas, se traslada a uno de los polos de la célula, mientras que el otro cromosoma homólogo, también con dos cromátidas unidas, segrega al polo opuesto de la célula. En Anafase II de la meiosis, las dos cromátidas de cada cromosoma se separan y se mueven hacia los polos opuestos de la célula. En cada una de estas dos anafases meióticas, es posible que los defectos del ADN y/o huso mitótico/cinetocoro pueden conducir a cromosomas enteros retrasados y/o fragmentos de cromosomas acéntricos y resultar en la formación MN en la línea germinal. Estos eventos de daño cromosómico se deben principalmente a (i) herencia o adquisición de defectos genéticos en el mantenimiento del genoma y/o (ii) una insuficiencia de micronutrientes necesarios como cofactores para las proteínas implicadas en la síntesis de ADN o la reparación y/o (iii) la exposición a genotóxicos. La formación de MN puede ocurrir en los tejidos de proliferación rápida, como la línea germinal en los hombres, en la placenta, el embrión y en los diversos órganos del feto durante la gestación. Los resultados significativos de MN en dosis de genes alterados (ganancias o pérdidas) en función de la distribución de MN en células hijas, con frecuencia se asocian con una reducción de la expresión génica. Tales eventos genéticos significativos son propensos a tener importantes consecuencias sobre la capacidad reproductiva con respecto a la fertilidad, así como los resultados del embarazo. Es por esta razón que existe un creciente interés en la relación entre la expresión de MN y la salud reproductiva en humanos (**Fenech, 2011**).

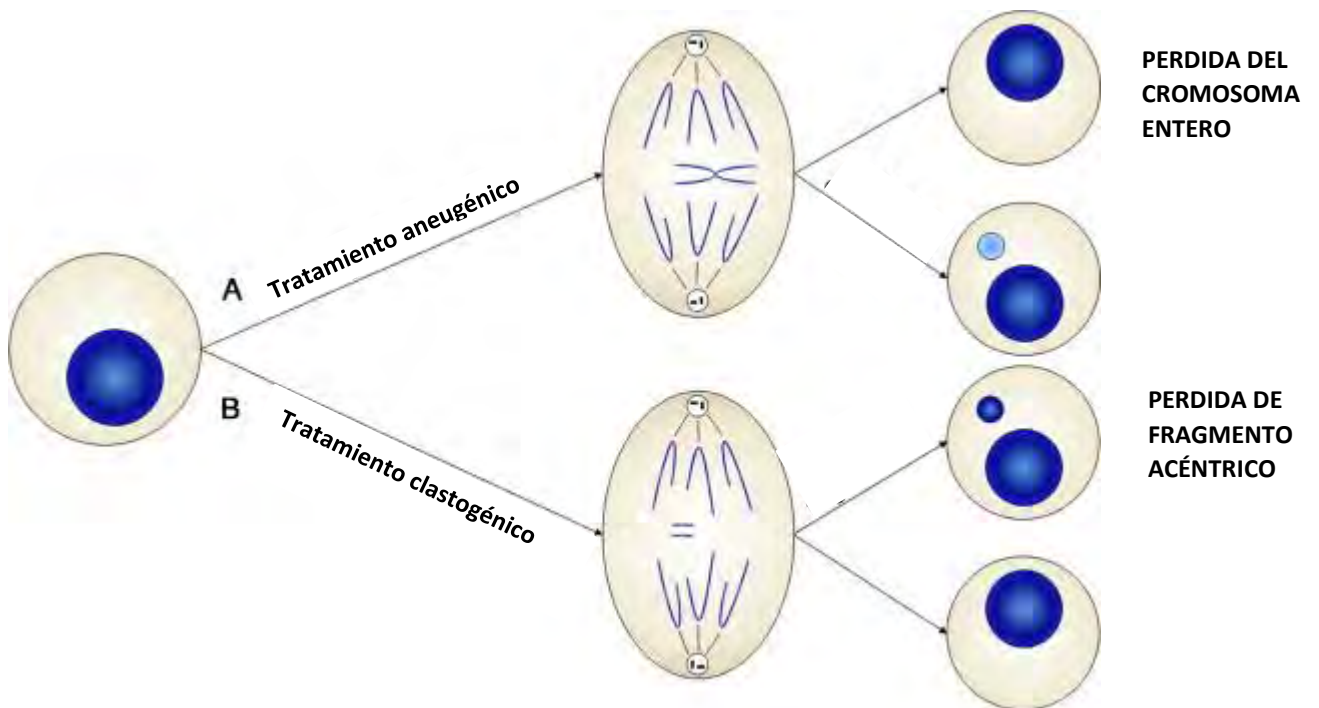


**Figura 1.** Formación MN y PN en células sometidas a división nuclear. Un MN proviene de cualquiera de los cromosomas enteros retrasados o fragmentos cromosómicos acéntricos. Un PN proviene de cromosomas dicéntricos que pueden ser causados por mala reparación de roturas en el ADN de doble filamento o fusiones finales de los telómeros. Estos eventos sólo se pueden observar en las células que completan la división nuclear, que son reconocidos por su apariencia binucleada después de bloquear la citocinesis con citocalasina-B (Fenech *et al.*, 2011).

Algunos micronúcleos también pueden derivarse de la rotura de los puentes nucleoplásmicos en anafase, originalmente formados a partir de cromosomas dicéntricos, unión de cromátidas hermanas o cromosomas unidos por la fusión de los telómeros. La frecuencia de micronúcleos se incrementa por la exposición a agentes clastogénicos y aneugénicos en células que muestran inestabilidad genómica (Lindberg *et al.*, 2007).

La evaluación de micronúcleos con la técnica bloqueo de la citocinesis proporciona una metodología robusta para la puntuación en las células que sean dividido una vez. Más tarde, el uso del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y aplicando la técnica FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) con el uso de sondas centroméricas y del cinetocoro,

los científicos demuestran que los micronúcleos también puede contener cromosomas enteros. Por lo tanto, la detección del cinetocoro y centrómeros en micronúcleos es muy útil para categorizar agentes potencialmente genotóxicos, tales como agentes aneugénicos o clastogénico y para identificar el mecanismo por el cual se indujeron los micronúcleos.



**Figura 2.** Mecanismos de formación de micronúcleos. (A) Los agentes aneugénicos impiden la formación del huso mitótico durante la mitosis. El uso de estos agentes genera micronúcleos con cromosomas enteros rezagados en anafase. Estos cromosomas se quedan fuera del núcleo de la célula, al final de la mitosis; por lo tanto, las células hijas llevan micronúcleos con cromosomas enteros. El ADN en los micronúcleos podría equilibrar el ADN nuclear y el resultado en un genoma completo, o ser adicional al genoma de la célula. (B) Los agentes clastogénicos inducen micronúcleos por romper la doble hélice del ADN, formando de este modo fragmentos acéntricos. Estos fragmentos son incapaces de adherirse a las fibras del huso e entregarse en los núcleos hijos, y por lo tanto se quedan atrás durante la mitosis (Terradas *et al.*, 2010).

Los agentes aneugénicos pueden inducir aumento de cromosomas y los cromosomas que van a la zaga en anafase pueden estar rodeados por la envoltura nuclear, formando

micronúcleos. Los agentes clastogénicos pueden inducir rupturas cromosómicas que producen fragmentos acéntricos que son fácilmente incluidos en micronúcleos (**Terradas et al., 2010**).

En algunos sistemas celulares, los micronúcleos se consideran como material genético que se pierde de la célula, mientras que otros estudios sugieren que el ADN micronuclear se transcribe activamente y sus genes se expresa plenamente (**Terradas et al., 2010**).

### **1.5. Puentes nucleoplásmicos**

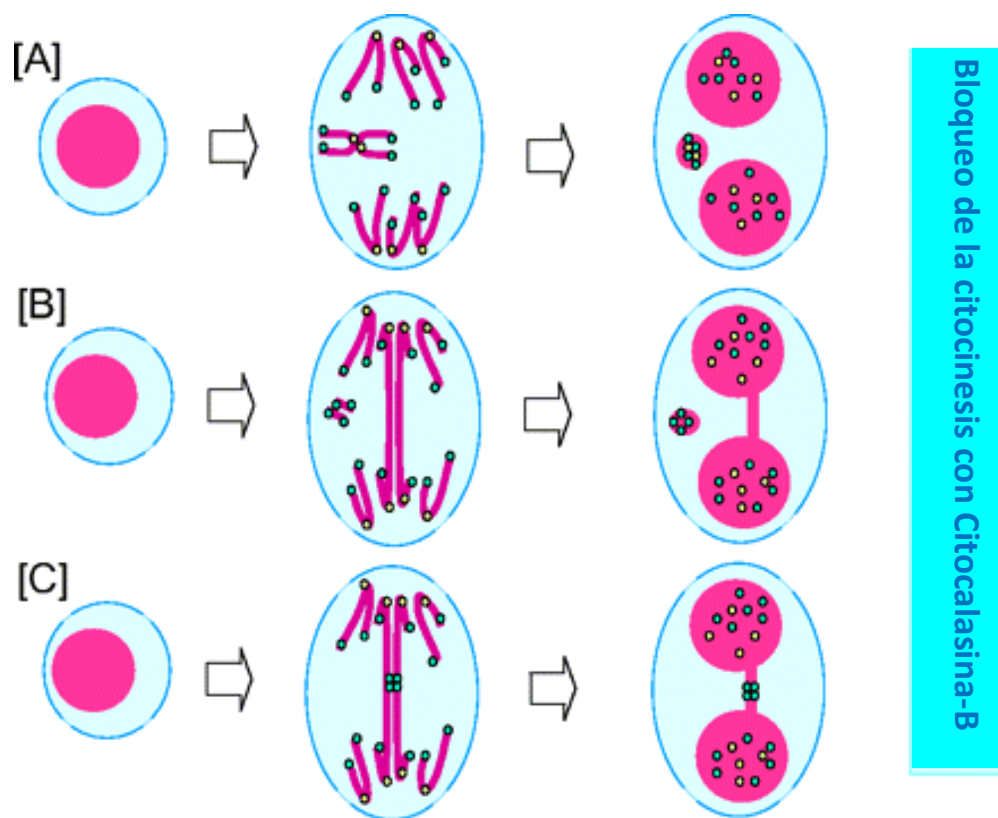
Los puentes nucleoplásmicos son otro indicador de daño en el ADN a partir de cromosomas dicéntricos que se forman a través de mala reparación de roturas en el ADN y los eventos de fusión de los telómeros. Debido a estos orígenes muy específicos, la evaluación de los puentes puede ayudar en la interpretación de los datos de micronúcleos o proporcionar información adicional que no está disponible a través de la evaluación de micronúcleos (**Cheong et al., 2013**).

Los Puentes Nucleoplásmicos (PN) se originan durante anafase cuando los centrómeros de un cromosoma dicéntrico son jalados a los polos opuestos de la célula durante la mitosis. En la ausencia de rotura del puente en anafase, la membrana nuclear finalmente rodea los núcleos hijos y la fibra de cromatina que forma la unión entre los núcleos, forma un puente nucleoplásmico, por lo general se rompen durante la citocinesis, pero se pueden acumular en las células cuando se bloquea la citocinesis utilizando el inhibidor citocalasina-B, cuando este puente nucleoplásmico se llega a romper, se generan micronúcleos en el citoplasma de la célula binucleada (**Fenech et al., 2011**).

Los cromosomas dicéntricos son el resultado de la disfunción telomérica, consiste por la fusión de dos extremos de los cromosomas no protegidos, o por la fusión de un cromosoma roto y un extremo sin protección. Una vez que un puente se rompe, los extremos de los cromosomas no protegidos resultantes, proporcionan la base del siguiente ciclo (rotura-

fusión-puente). Los micronúcleos con fragmentos acéntricos pueden formarse a partir de puentes rotos (**Terradas *et al.*, 2010**).

También los cromosomas dicéntricos son originados por mala reparación de rupturas cromosómicas o fusiones de las partes finales de los telómeros. Estos últimos son debidos a un montaje inadecuado de la estructura de la proteína que encapsula y protege el telómero ya sea por el acortamiento excesivo de los telómeros o supresión y / o daño en la secuencia de base de los telómeros (**Fenech *et al.*, 2011**).



**Figura 3.** Las sondas centroméricas y teloméricas pueden ser utilizados para distinguir (i) entre MN originados por la pérdida de todo el cromosoma o solo un fragmento (ii) Puentes nucleoplásmicos originados de cromosomas dicéntricos resultantes de mala reparación del rompimiento de la cadena de ADN. (A) MN que se origina a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos y (B) cromosomas dicéntricos causados por fusiones finales de los telómeros (C) Puente nucleoplásmico procedente de un mecanismo de fusión telomérica. Los puntos amarillos representan sondas que hibridan con la región centromérica de los cromosomas. Los puntos azules claros representan sondas que hibridan con las secuencias teloméricas en los cromosomas (Fenech *et al.*, 2011).



## 1.6. Yemas nucleares

Durante las últimas décadas, otras anomalías conocidas como Yemas Nucleares (YN) se han asociado con eventos de inestabilidad cromosómica, se han observado en cultivos bajo fuertes condiciones selectivas, donde se inducen la amplificación de genes, así como la deficiencia de ácido fólico (**Fenech *et al.*, 2011**).

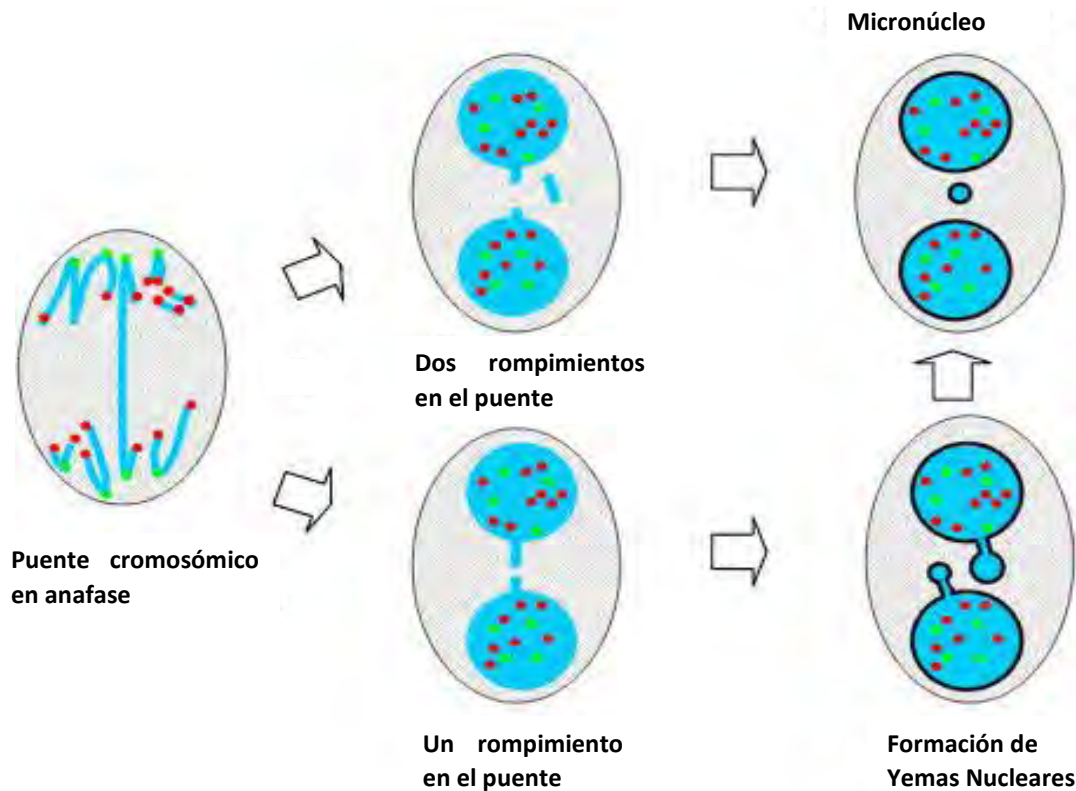
Las yemas nucleares también pueden observarse con el ensayo MNBC. Las yemas se forman por la eliminación de ADN amplificado durante la interfase, como un paso intermedio en la formación de micronúcleos, y también se producen a partir de los restos de puentes nucleoplásmicos rotos (**Cheong *et al.*, 2013**).

La teoría convencional supone que los micronúcleos se forman exclusivamente en la división celular. Sin embargo, por mucho tiempo ha sido sugerido que los micronúcleos, además, se pueden generar a través de gemación nuclear en interfase. Las Yemas nucleares, son los precursores tentativos de los micronúcleos, son morfológicamente similares a los micronúcleos con la excepción de que se unen al núcleo por una conexión nucleoplásmica. Se observan en las células humanas normales, a pesar de que parecen ser más raras que los micronúcleos en muchos tipos de células (**Lindberg *et al.*, 2007**).

Las yemas nucleares parecen contener fragmentos cromosómicos principalmente acéntricos, con una alta proporción de fragmentos intersticiales que son raros en los micronúcleos. La privación de folato aumenta los micronúcleos, yemas nucleares con fragmentos terminales, yemas nucleares con fragmentos intersticiales, yemas nucleares y micronúcleos con cromosomas enteros (**Lindberg *et al.*, 2007**).

Las yemas nucleares albergan ADN intersticial claramente con más frecuencia y cromosomas enteros o terminales con menos frecuencia que los micronúcleos. Se han propuesto cuatro modelos para la generación de yemas nucleares. Dos de ellos asumen que las yemas nucleares se generan en la división celular, puentes rotos rezagos en anafase. Las yemas nucleares se forman en la fase S, lo que representa la amplificación del núcleo cuya replicación ha fallado (**Lindberg *et al.*, 2007**).

La formación de yemas nucleares se puede generar mediante los puentes nucleoplásmicos rotos en anafase, parece ser una explicación atractiva. Un modelo en el que las yemas nucleares y los micronúcleos se forman a partir de restos de puentes en anafase se muestra en la figura. 4.



**Figura 4.** Modelo para la formación de un micronúcleo (parte superior) y yemas nucleares (parte inferior) debido a la rotura de un puente cromosómico durante la telofase. Para simplificar, sólo se muestran cuatro cromosomas. Los puntos verdes indican ADN centromérico, y los puntos rojos ADN telomérico. La envoltura nuclear se muestra con una línea negra. El puente en el ejemplo está formado por una cromátida dicéntrica y carece de centrómero o secuencias teloméricas. Los cromosomas dicéntricos proceden de la fusión telomérica, también podrían dar por ADN telomérico. Una de las yemas nucleares mostradas posteriormente forma un micronúcleo. El rompimiento del puente puede ocurrir con menos frecuencia en las células con la citocinesis bloqueada, debido a que la distancia interpolar es más corta y la tensión mecánica entre los polos probablemente más débil que en las células no bloqueadas (Lindberg *et al.*, 2007).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Existen factores capaces de influir o modificar el daño nuclear presente en una célula: edad, género, contaminación ambiental o exposición a quimioterapéuticos. Por lo cual se genera una gran inquietud, de los riesgos laborales a los que se encuentra expuesto el personal de enfermería que manipula estas sustancias, debido a que, en una rutina hospitalaria, se utilizan varios agentes quimioterapéuticos, ya sea para el mantenimiento, diagnóstico y tratamiento del paciente. Por lo tanto, es necesario establecer el daño genotóxico, que se ejerce al manejar estos compuestos durante periodos extensos y sin el autocuidado necesario (bata, guantes, cubre boca, por ejemplo). Al utilizar un biomarcador de exposición, con el cual se pueda detectar daño genotóxico y citotóxico iniciales, se podría alertar sobre el riesgo laboral que se corre y que puede influir en la salud de las enfermeras expuestas.

## **3. HIPÓTESIS.**

Si los quimioterapéuticos son capaces de inducir daño nuclear y alterar el proceso de división nuclear, el personal de enfermería expuesto laboralmente a estas sustancias mediante diferentes vías de ingreso como son ingestión, inhalación y absorción cutánea, entonces la integridad de su ADN y la división nuclear se verán afectadas de manera significativa.

## **4. OBJETIVOS**

### **General**

- Evaluar el daño genotóxico y citostático en linfocitos humanos de sangre periférica mediante el ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis en el personal de enfermería expuesto laboralmente a quimioterapéuticos.

### **Particulares**

- Evaluar el daño genotóxico antiguo, mediante la presencia de micronúcleos (MN), y yemas nucleares (YN) en células mononucleadas.
- Evaluar el daño genotóxico reciente, mediante la presencia de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN) y yemas nucleares (YN) en células binucleadas.
- Establecer la frecuencia de daño antiguo con respecto a daño reciente.
- Relacionar los resultados con los factores; tiempo de exposición, edad y género.
- Analizar el efecto citostático mediante el índice de división nuclear (IDN).

## **5. MATERIALES Y MÉTODO**

Estudio de corte descriptivo, transversal y observacional.

El personal de enfermería que participó en este estudio, lo hizo de manera voluntaria, sin tener ninguna remuneración por ello, firmando el consentimiento informado y posteriormente respondiendo un cuestionario (Anexo 2) sobre su rutina diaria.

## 5.1 Criterios de inclusión y exclusión

**Criterios de inclusión del grupo expuesto a quimioterapéuticos:** Personal de enfermería que prepare y maneje quimioterapéuticos; enfermeras(os) que acepten participar en este estudio y que hayan firmado el consentimiento informado.

**Criterios de exclusión del grupo expuesto a quimioterapéuticos:** Personal de enfermería, participantes que no preparen y/o no apliquen quimioterapéuticos; personal de enfermería a quienes no se le hayan tomado las muestras completas para el estudio; enfermeras(os) que hayan recibido tratamiento con radioterapia y/o con citostáticos; que se encuentre adscrito a un servicio de radioterapia; adscripción como máximo dos años previos a esta investigación en servicios que manejen gases anestésicos. Enfermeras(os) que en dos instituciones de salud o sitios preparen y/o manejen quimioterapéuticos.

**Criterios de inclusión grupo control:** Personal de enfermería que no prepare ni maneje quimioterapéuticos; que no se encuentre adscrito a servicios donde se utilicen gases anestésicos o de radioterapia por lo menos en los últimos dos años; que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

**Criterios de exclusión grupo control:** Personal de enfermería que no acepte participar en el presente estudio o que no firmen el consentimiento informado; que hayan preparado y manejado quimioterapéuticos o que se les ubicara en servicios donde manejan gases anestésicos o de radioterapia dentro de los dos años previos a esta investigación; que hayan recibido tratamiento con citostáticos y/o radioterapia anticipado. Enfermeras(os) que, en una institución diferente a la participante en el estudio, preparen o manejen quimioterapéuticos.

**5.2. Tamaño de muestra:** El grupo de casos positivos está constituido por 100 enfermeras (os), expuestas laboralmente a quimioterapéuticos, respetando los criterios de inclusión y exclusión ya mencionados. El grupo control está constituido por 75 enfermeras (os), no expuestas a quimioterapéuticos, respetando los criterios de inclusión y exclusión ya

mencionados. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de las siguientes instituciones, ubicadas en Morelia, Michoacán:

- Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano López Mateos”
- Centro Estatal de Atención Oncológica
- Hospital de la Mujer,
- Hospital General “Dr. Miguel Silva”.

### **5.3. Método del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.**

Se extrajo sangre periférica de enfermeras expuestas a quimioterapéuticos de diferentes instituciones de salud de Morelia y se trasladaron a  $-3^{\circ}\text{C}$ , a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. La siembra de linfocitos se llevó a cabo colocando 3 ml de medio RPMI 1640 (SIGMA, U.S.A.), suplementado con fitohemaglutinina (SIGMA, U.S.A.), Gentamicina (SIGMA, U.S.A.) y 700  $\mu\text{l}$  de sangre completa. Los cultivos fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. A las 44 horas de haber realizado la siembra se añadió 6 $\mu\text{g/ml}$  de Citocalasina B (SIGMA, U.S.A.), para bloquear el proceso de citocinesis. Una vez cumplido el tiempo de cultivo, las muestras fueron centrifugadas (EQUIPAR, MÉXICO) a 1000 RPM, durante 5 minutos, el paquete celular se sometió a un choque hipotónico Cloruro de Potasio (J.T. BAKER, MÉXICO) (KCl 0.075M) por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . La fijación de las células se realizó con una solución de Metanol-Ácido acético (J. T. BAKER, MÉXICO) en una proporción 85:15, efectuando dos cambios de la solución fijadora. Al término de la última fijación el botón celular se resuspendido en 0.5 ml de la solución metanol-ácido acético. Las preparaciones de laminillas se llevaron a cabo por goteo y se tiñeron con May Grünwald-Giemsa (SIGMA, U.S.A.), modificada para MN, las laminillas se observaron al doble ciego en microscopio (NIKON, JAPÓN) de campo claro en 10X, 40X y 100X aumentos.

**Citocalasina B:** Se disolvió el contenido del frasco (5 mg) en 1.6 ml de DMSO (SIGMA, U.S.A.) obteniendo así el stock 1 (sb1) se extrajo 100  $\mu\text{l}$  del sb1 y se completó 1 ml con 900  $\mu\text{l}$  de agua inyectable (PISA, MÉXICO) stock 2 (sb2). Del sb2 se tomaron 100  $\mu\text{l}$  que fueron

agregados a los cultivos (5 ml de medio) la concentración final fue de 6 mg/ml se almaceno en el refrigerador.

#### **5.4. Análisis estadístico**

**Daño nuclear:** Se evaluaron 1000 células mononucleadas por individuo para determinar la frecuencia de MN. Se evaluaron 1000 células mononucleadas por individuo para determinar la frecuencia de YN en microscopía de campo claro (40X y 100X), para establecer diferencias estadísticas se comparó contra la muestra control aplicando “t” Student, el nivel de significancia empleado fue ( $p < 0.005$ ). Los resultados se expresaron en frecuencias de daño nuclear por células, se calculó la media  $\pm$  E.E. (Error estándar).

Se evaluaron 1000 células binucleadas por individuo para determinar la frecuencia de MN. Se evaluaron 1000 células binucleadas por individuo para determinar la frecuencia de PN. Se evaluaron 1000 células binucleadas por individuo para determinar la frecuencia de YN en microscopía (NIKON, JAPÓN), de campo claro (40X y 100X), para establecer diferencias estadísticas se comparó contra la muestra control aplicando “t” Student, el nivel de significancia empleado fue ( $p < 0.0005$  y  $p < 0.005$ ). Los resultados se expresaron en frecuencias de daño nuclear por células, se calculó la media  $\pm$  E.E. (Error estándar).

**Citostaticidad:** Se evaluaron 500 células polinucleadas, la frecuencia de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas y pentanucleadas mediante microscopia de campo claro (40x y 100x). Se estimó el índice de división nuclear (IDN). La prueba estadística aplicada fue Z para proporciones, se calculó la media  $\pm$  E.E. (Error estándar).

$$\text{IDN} = \text{Mono} + 2(\text{Bi}) + 3(\text{Tri}) + 4(\text{Tetra}) + 5(\text{Penta}) / \text{Total de células polinucleadas.}$$

## 6. RESULTADOS

### Genotoxicidad

En el presente trabajo se analizó mediante el ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis *in vitro* en linfocitos, el daño genotóxico representado por Micronúcleos, Puentes Nucleoplásmicos y Yemas Nucleares (MN, PN y YN) y el daño citostático fue evaluado mediante el Índice de División Nuclear (IDN).

En este estudio el tiempo de exposición a quimioterapéuticos, la edad y el género (**tabla 2**) fueron los factores que se consideraron podrían afectar el número de micronúcleos. En relación con la edad, ha sido ampliamente estudiada, relacionándose mayor edad con mayor índice de MN. En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MN incrementa cuando se superan los 35 años de edad (**Zalacain *et al.*, 2005**), por lo que se decidió contemplar este factor.

**Tabla 2. Características sociodemográficas de la muestra estudiada.**

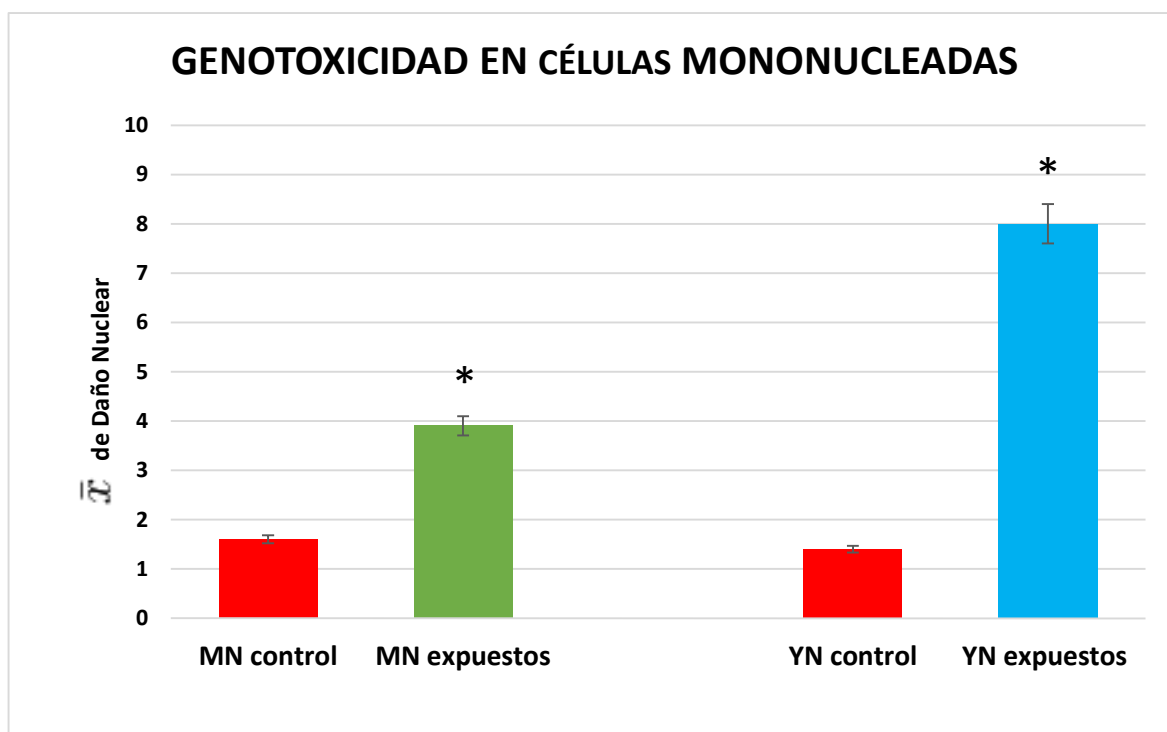
	Enfermeras (os)	Intervalo de edad	Edad (años)	Tiempo de exposición (meses)	Género (F)	Género (M)
	N	-----	media ± D.E.	media ± D.E.	N	N
<b>TOTAL</b>	175	-----	-----	-----	-----	-----
<b>CONTROLES</b>	75	21-55	34.4 ± 7.3	-----	70	5
<b>EXPUESTOS</b>	100	21 - 55	36.4 ± 8.4	38.2 ± 45.6	92	8

(Media) ± D.E. (División Estándar)

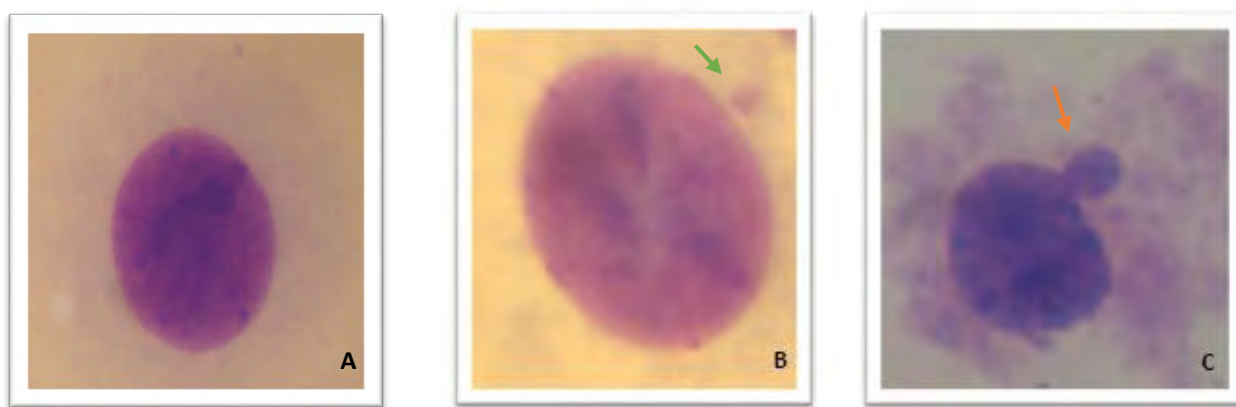


## 6.1 Genotoxicidad en células mononucleadas

Los resultados de frecuencia de daño nuclear en células mononucleadas se representan en la **figura 5** y **tabla 3** en células linfocíticas por microscopía de campo claro en **figura 6**.



**Figura 5.** Micronúcleos (MN) y Yemas nucleares (YN) en cultivo de linfocitos humanos de personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos. N-control= 75. N-expuestos 100. \* $p < 0.005$  (*t*-Student).



**Figura 6. Microfotografías de linfocitos con bloqueo de la citocinesis:**

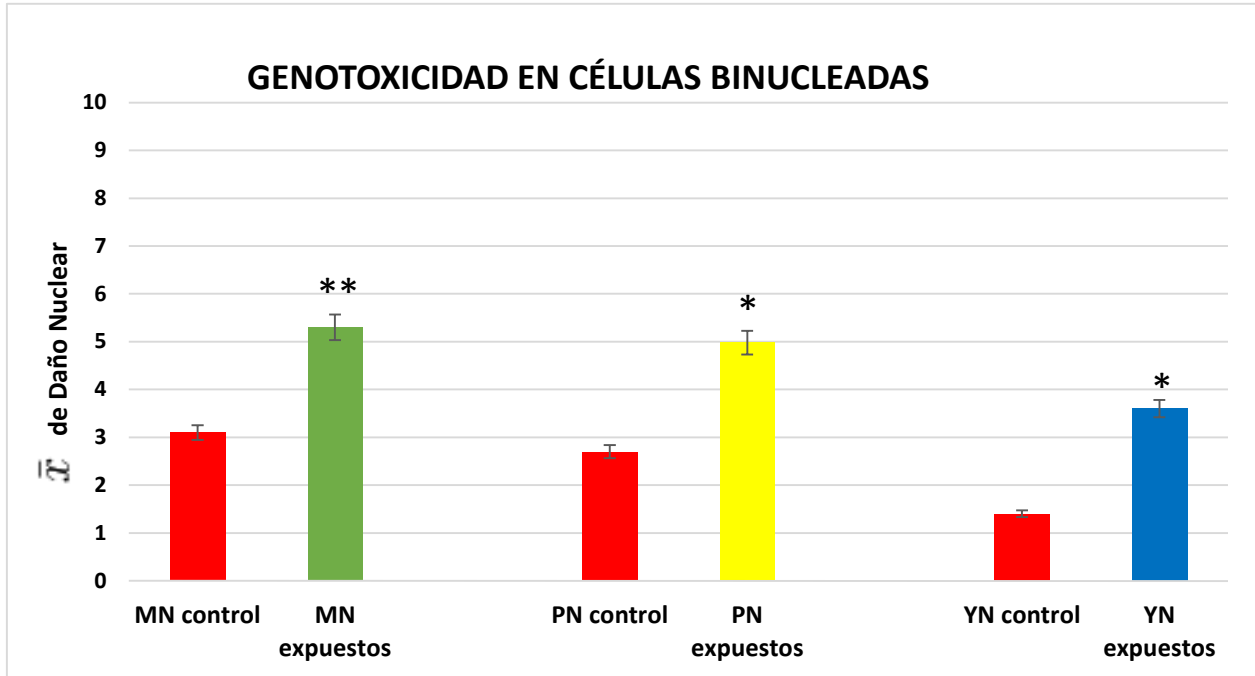
(A) Célula mononucleada con morfología normal.

(B) Célula mononucleada con Micronúcleo.

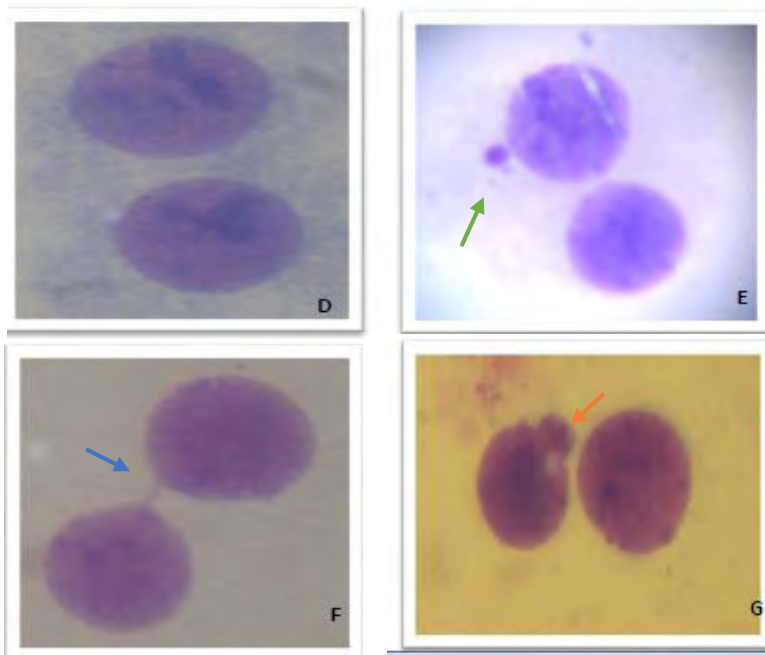
(C) Célula mononucleada con Yema Nuclear.

## 6.2 Genotoxicidad en células binucleadas

Los resultados de frecuencia de daño nuclear en células binucleadas se representan en la **figura 7** y **tabla 3** en células linfocíticas por microscopía de campo claro en **figura 8**.



**Figura 7.** Micronúcleos (MN), Puentes nucleoplásmicos (PN) y Yemas nucleares (YN), en cultivo de linfocitos humanos de personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos. N-control =75 N-expuestos =100. \*\* $p < 0.0005$  \* $p < 0.005$  (*t*- Student).



**Figura 8.** Microfotografías de linfocitos con bloqueo de la citocinesis:

- (D) Célula binucleada con morfología normal.
- (E) Célula binucleada con Micronúcleo.
- (F) Célula binucleada con Puente Nucleoplásmico.
- (G) Célula binucleada con Yema Nuclear.

**Tabla 3. Genotoxicidad en células mononucleadas y células binucleadas. Micronúcleos (MN), puente nucleoplásmicos (PN) y Yemas nucleares (YN), en personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos.**

	Número de Células	Frecuencia de daño nuclear	% daño nuclear	media ± E.E.
<b>CÉLULAS MONONUCLEADAS CON:</b>				
<b>MICRONÚCLEOS</b>				
Controles	75 000	123	0.16	1.6 ± 0.16
Expuestos	100 000	395	0.39	3.9 ± 0.36*
<b>YEMAS NUCLEARES</b>				
Controles	75 000	105	0.14	1.4 ± 0.24
Expuestos	100 000	809	0.80	8.0 ± 0.88*
<b>CÉLULAS BINUCLEADAS CON:</b>				
<b>MICRONÚCLEOS</b>				
Controles	75 000	239	0.31	3.1 ± 0.25
Expuestos	100 000	533	0.53	5.3 ± 0.46**
<b>PUENTES NUCLEOPLÁSMICOS</b>				
Controles	75 000	207	0.27	2.7 ± 0.30
Expuestos	100 000	498	0.49	4.9 ± 0.78*
<b>YEMAS NUCLEARES</b>				
Controles	75 000	106	0.14	1.4 ± 0.15
Expuestos	100 000	362	0.36	3.6 ± 0.35*

N= Controles (75) N=Expuestos (100). (Media) ± E.E. (Error Estándar). \*\*p<0.0005 \*p<0.005 (t- Student).

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la **tabla 2** se da una descripción completa de los grupos en los cuales fue dividida la muestra estudiada. La muestra fue dividida en rango de edad el cual es amplio de 22- 55 años. En el tiempo de exposición a quimioterapéuticos la media fue de  $38.2 \pm 45.6$  meses. La media de la edad fue de  $34.4 \pm 7.3$  y  $36.4 \pm 8.4$  en los controles y expuestos respectivamente. El género es una característica que tiene una diferencia en el número de individuos muestreados, más del 90% del personal de enfermería es femenino, con lo cual se obtuvo una frecuencia mayor de MN en este género, debido a que las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MN incrementa cuando se superan los 35 años de edad (**Zalacain et al., 2005**). La edad tiene un amplio rango, sin embargo, el personal que tuvo daño genotóxico aumentado respecto a MN se encuentra por debajo de la media de edad, se le puede atribuir al estilo de vida y que aún no manejan el autocuidado satisfactoriamente, en el cual se incluyen bata, guantes, gorro, lentes y el uso de la campana de flujo laminar para la preparación y/o administración de los quimioterapéuticos.

Los resultados de genotoxicidad respecto al tiempo de exposición, se puede señalar que las enfermeras han permanecido manipulando los quimioterapéuticos por más de 10 años, las enfermeras con más tiempo de exposición representan un daño nuclear aumentado con respecto al control, no solo en la frecuencia de Micronúcleos sino también en Puentes Nucleoplásmicos y Yemas Nucleares, esto coincidió con lo que indica **Laffon et al.**, “después de 10 años de exposición a quimioterapéuticos el nivel de daño nuclear es acumulativo” y esto se puede ver representado en células mononucleadas. Respecto al género se obtuvo mayor genotoxicidad en las enfermeras, sin embargo, no se tiene una diferencia equilibrada de género para poder resaltar estos resultados.

## 7.1. Genotoxicidad en células mononucleadas

La incidencia de daño nuclear en Células Mononucleadas se evaluó en 350,000 células de expuestos y controles. La media de micronúcleos en cultivo linfocitos con bloqueo de la citocinesis analizados **tabla 3, figura 5 y 6 (B)**, en los individuos expuestos a quimioterapéuticos fue de  $3.9 \pm 0.36^*$  en comparación con su control que es de  $1.6 \pm 0.16$  lo cual podría indicar que hay rompimiento cromosómico o cromosomas completos que no fueron incluidos en núcleos hijos. La media de Yemas Nucleares en el mismo tipo de Células Mononucleadas **tabla 3, figura 5 y 6 (C)**, en muestra expuesta a quimioterapéuticos fue de  $8.0 \pm 0.88^*$  en comparación con su control que fue de  $1.4 \pm 0.24$ , es evidente que hay un incremento en el daño nuclear entre las muestras, esto nos podría indicar amplificaciones génicas, causado por la exposición prolongada a los quimioterapéuticos. El daño nuclear generado en células mononucleadas, representado por micronúcleos y yemas nucleares, revela que hay mala reparación en el ADN, que el daño es antiguo y se acumula desde divisiones anteriores.

Los resultados muestran que en células mononucleadas, la frecuencia de daño nuclear analizado mediante micronúcleos y yemas nucleares se incrementó significativamente ( $p < 0.005$ ) en comparación con el control. Lo anterior indica que la manipulación de quimioterapéuticos está generando genotoxicidad. El incremento de micronúcleos y yemas nucleares en células mononucleadas, puede atribuirse al tiempo de exposición agentes quimioterapéuticos debido a que estos fármacos interactúan con el ADN y/o sus precursores y causan daños irreparables en células sanas y malignas (**Martínez et al., 2002**) y se propone este daño como antiguo, debido a que la mayor parte de los linfocitos de sangre periférica son células T de larga vida y son estas células las que se estimulan para dividirse principalmente por el mitógeno (fitohemaglutinina), una parte de estos linfocitos pueden ya contener MN u otro tipo de daño nuclear y mucho de este daño se ha podido acumular en el núcleo (**Kirsch et al., 2014**). Por lo tanto, el daño nuclear que se encuentra en células mononucleadas, se ha generado antes de que los linfocitos sean estimulados para dividirse y se puede expresar en MN o YN en el ensayo MNBC.

Experimentos *in vitro* con el ensayo de Micronúcleos sin bloqueo de la citocinesis, en linfocitos que fueron expuestos sólo en fase G0 (es decir, antes de la estimulación por algún mitógeno) muestran que el índice de MN, se puede detectar de manera eficiente, en la exposición a agentes que inducen rompimiento de las cadenas de ADN (**Kirsch et al., 2014**), ello conduce a fragmentos acéntrico de un ciclo celular, si se dejan sin reparar o si son mal reparados. El daño nuclear incrementado en células mononucleadas en la muestra expuesta a quimioterapéuticos, nos está indicando que hay una mala reparación en la cadena de ADN y que el daño es acumulado desde divisiones anteriores.

## **7.2. Genotoxicidad en células binucleadas**

La incidencia de daño nuclear en células binucleadas se evaluó en 525,000 células. La media de micronúcleos en cultivo linfocitos con bloqueo de la citocinesis **tabla 3, figura 7 y 8 (E)**, en la muestra expuesta a quimioterapéuticos fue de  $5.3 \pm 0.46^{**}$  en comparación con su control que es de  $3.1 \pm 0.25$  a pesar de que la diferencia no es tan evidente como en las células mononucleadas, la diferencia fue significativa ( $p < 0.0005$ ) el daño nuclear puede estar causado por fragmentación cromosómica o por cromosomas completos que no son integrados a los núcleos hijos al final de la telofase durante la mitosis, porque no se adhieren correctamente con el eje durante el proceso de segregación en anafase, los MN también pueden derivarse de la rotura de los puentes nucleoplásmicos en anafase. La media de Puentes Nucleoplásmicos en linfocitos **tabla 3, figura 7 y 8 (F)**, en la muestra expuesta a quimioterapéuticos fue de  $4.9 \pm 0.78^*$  en comparación con su control que fue de  $2.7 \pm 0.30$  la diferencia fue significativa ( $p < 0.005$ ), estas estructuras se pueden originar por varias vías por consecuencia de arreglos cromosómicos, sin embargo, los PN son principalmente generados por cromosomas dicéntricos. La media de Yemas Nucleares en linfocitos **tabla 3, figura 7 y 8 (G)**, en la muestra expuesta a quimioterapéuticos fue de  $3.6 \pm 0.35^*$  en comparación con su control que fue de  $1.4 \pm 0.15$  la diferencia fue significativa ( $p < 0.005$ ) este parámetro casi triplica la incidencia en la muestra expuesta, es de suma importancia, ya que nos está indicando que el evento genotóxico puede ser debido a amplificaciones génicas.

En células binucleadas los resultados nos indica incremento en el daño nuclear en los tres parámetros evaluados, micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y yemas nucleares comparados con su control. El daño nuclear en este tipo de células es reciente ya que el ensayo nos permite identificar a células que han completado una mitosis por su apariencia binucleada.

La frecuencia de micronúcleos (MN), posiblemente tiene que ver con dos eventos, **a)** interacción indirecta de los quimioterapéuticos con el ADN: efecto aneugénico, se están alterando las estructuras secundarias como el huso mitótico, y los quimioterapéuticos responsables de estos eventos son: Vincristina, Vinblastina, estos productos químicos actúan principalmente a través de la interferencia con el aparato del huso mitótico necesario para el proceso de la segregación cromosómica y división celular, a los cuales están expuestas las (os) enfermeras (os). **b)** interacción directa de los quimioterapéuticos con el ADN: efecto clastogénico, los quimioterapéuticos que pueden generar este tipo de MN y a los cuales están expuestas las (os) enfermeras (os) son: Doxorrubicina, Cisplatino, estos productos pueden causar aberraciones cromosómicas estructurales o cambios numéricos cromosómicos incluyen principalmente la formación de pequeños o voluminosos aductos, enlaces cruzados en la cadena de ADN, y rompimiento de las cadenas de ADN,

Los puentes nucleoplásmicos (PN) pueden surgir de cromosomas dicéntricos causados por errores de reparación de roturas de ADN o debido a fusiones finales de los telómeros causados por la disfunción telomérica. Las yemas nucleares (YN) se originan a partir de la eliminación nuclear de los complejos de reparación del ADN no resuelto y el exceso de ADN amplificado; también pueden ser inducidos por la rotura de PN. Los PN y YN han ampliado el espectro de eventos de daño del ADN detectable mediante el ensayo de MNBC, pero las clases de productos químicos que inducen de manera eficiente estos biomarcadores se encuentran aún por definirse. El uso de PN en el ensayo MNBC es único entre los biomarcadores de genotoxicidad ya que es el único método que puede medir defectos en la separación de cromátidas durante anafase que conducen a la inestabilidad cromosómica

**(Kirsch et al., 2014).** La frecuencia de Yemas nucleares, nos indica que hay una mala reparación en la cadena de ADN y se están generando amplificaciones génicas. No se sabe con exactitud qué tipo de quimioterapéutico está generando este daño nuclear, sin embargo es evidente que hay un alto grado de genotoxicidad en las muestras analizadas.

Durante las últimas décadas, los agentes de quimioterapia contra el cáncer han comenzado a ofrecer gran esperanza para su control. Aunque los fármacos antineoplásicos ideales sólo deben destruir las células cancerosas y no hacer daño a los tejidos normales, la mayoría de estos fármacos tienen efectos genotóxicos en las células normales. Debido a que estos fármacos afectan directa o indirectamente el ADN, no sólo los pacientes con cáncer, sino también el personal que los maneja cotidianamente está en riesgo más alto de daño, en el ADN **(Rekhadevi et al., 2007)**. Los trabajadores de salud están expuestos a dosis mucho más bajas que los pacientes con cáncer, la exposición a dosis bajas durante un largo período de tiempo puede tener efectos a largo plazo sobre la salud de los trabajadores **(Moretti et al., 2014)**.

Los resultados obtenidos en este estudio respecto a daño nuclear se comparan con trabajos anteriores los cuales coinciden en que la exposición a fármacos anticancerígenos, citostáticos y quimioterapéuticos generan un daño nuclear superior en comparación a su control en lo que corresponde a Micronúcleos **(Moretti et al., 2014)**.

Los resultados similares a nuestro trabajo fueron reportados en otras investigaciones en las cuales también se evaluó el daño nuclear de enfermeras expuestas a quimioterapéuticos y los resultados coinciden en que hay un aumento estadísticamente significativo **(Rekhadevi et al., 2007; Ladeira et al., 2014; Moretti et al., 2014)**. Los datos sugieren que existe daño genotóxico relacionada con la exposición laboral a quimioterapéuticos en las enfermeras del área de oncología.



La genotoxicidad puede ser debido a los efectos combinados de todos o algunos de los quimioterapéuticos, no es posible atribuir el daño a algún agente en particular. Las mezclas de fármacos antineoplásicos en la exposición ocupacional a largo plazo pueden actuar como clastógenos en la molécula de ADN de células somáticas. Los resultados sugieren una relación entre la cantidad de medicamentos antineoplásicos manejados y efectos genotóxicos.

El ensayo de MN presenta muchas ventajas y debido a su capacidad para detectar tanto efecto clastogénico (por ejemplo, la rotura de cromosomas) y efectos aneugénicos (por ejemplo, interrupción del huso mitótico), podría ser una prueba de rutina en los programas de vigilancia de la salud ocupacional, de los trabajadores expuestos a quimioterapéuticos para monitorear los efectos de la exposición a largo plazo **(Sorsa et al., 2006)**.

## 8. RESULTADOS

### Citostaticidad

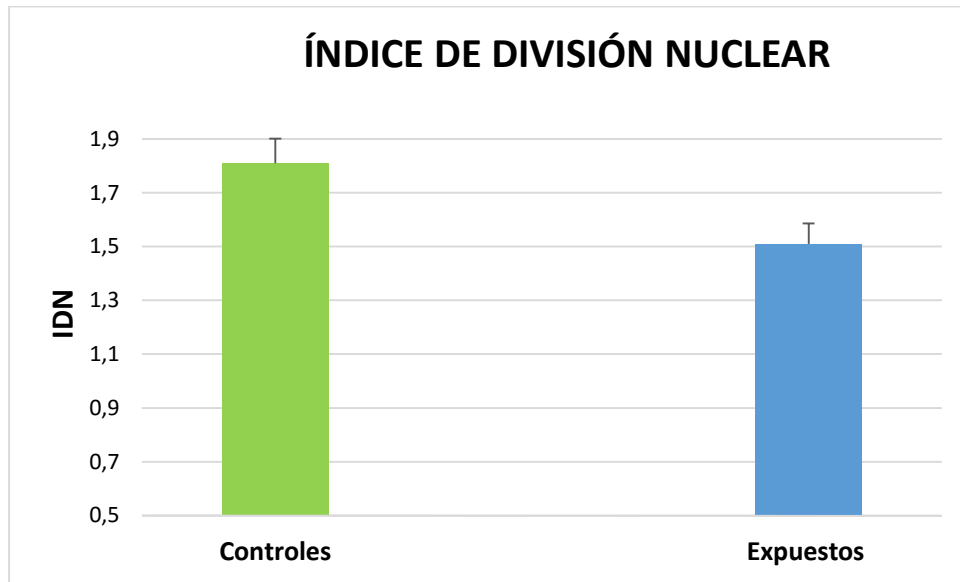
Fue analizada la frecuencia de células polinucleadas (**tabla 4**), observadas mediante microscopía de campo claro (40x) **figura 9, 10 y 11**.

**Tabla 4. Índice de División Nuclear (IDN), células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas en cultivo de linfocitos humanos, de personal de enfermería expuesto laboralmente a quimioterapéuticos.**

	N	%	media ± (E.E.)	IDN media ± (E.E.)
<b>Total, de células analizadas</b>				
Controles	37 500			1.81 ± 0.06
Expuestos	50 000			1.51 ± 0.02
<b>Células mononucleadas</b>				
Controles	15 298	41.1	194.9 ± 0.24	
Expuestos	26 872	53.744	268.7 ± 0.27	
<b>Células binucleadas</b>				
Controles	16 902	45.0	235.4 ± 0.28	
Expuestos	18 198	36.339	181.3 ± 0.27	
<b>Células trinucleadas</b>				
Controles	3 257	8.6	39.3 ± 0.3	
Expuestos	3 364	6.728	33.3 ± 0.33	
<b>Células tetranucleadas</b>				
Controles	1 342	3.5	17.8 ± 0.32	
Expuestos	1 088	2.176	11.3 ± 0.23	
<b>Células pentanucleadas</b>				
Controles	701	1.8	9.5 ± 0.35	
Expuestos	478	0.956	4.7 ± 0.22	

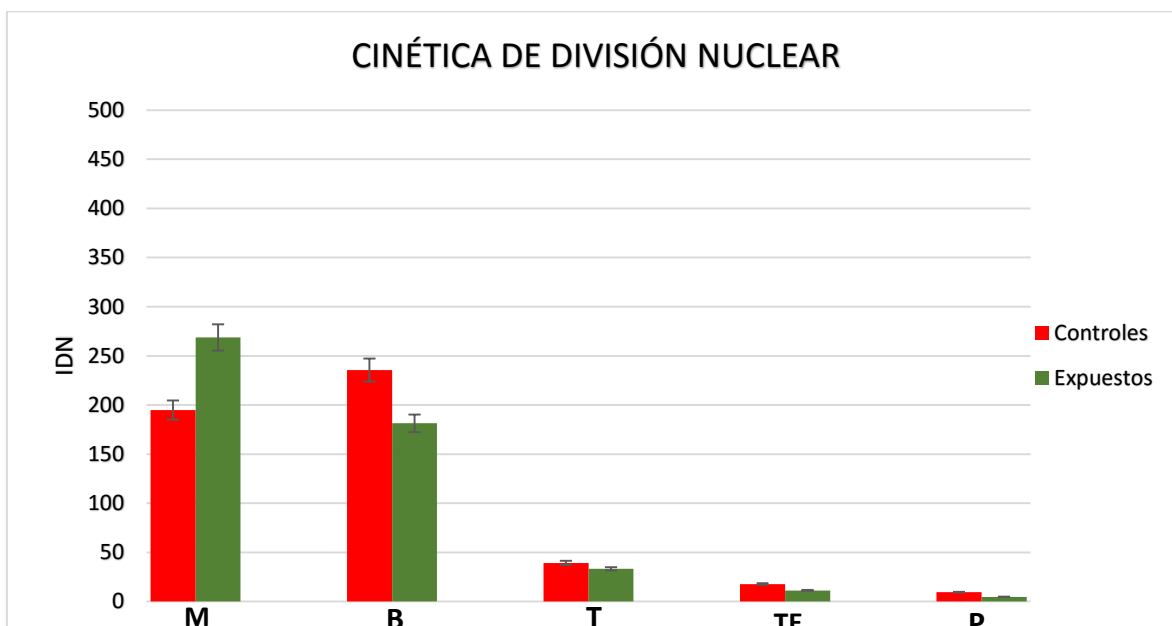
p<0.05 (Z para proporciones). Media ± E.E. (Error Estándar)

En la **figura 9** se muestra el IDN (Índice de División Nuclear) obtenido al evaluar las células polinucleadas en personal de enfermería expuesto laboralmente a quimioterapéuticos. Puede apreciarse que el IDN disminuye, pero no resulta ser estadísticamente significativo.

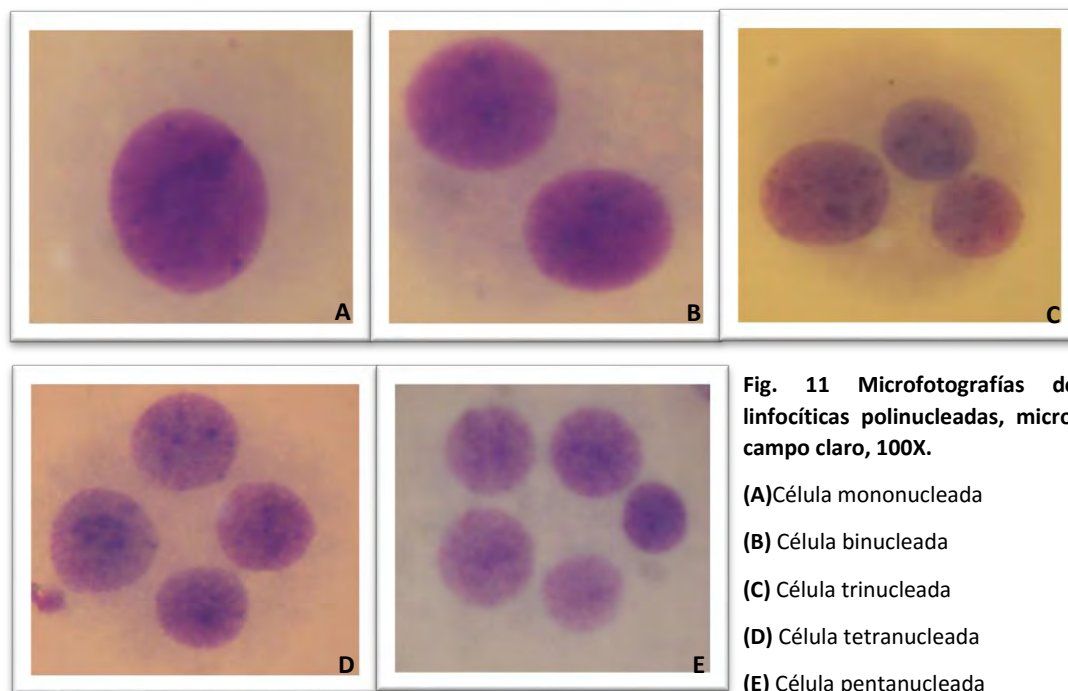


**Figura 9. Índice de división nuclear (IDN) en cultivo de linfocitos humanos de personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos. N-control =75 N-expuestos =100.  $p < 0.05$  (Z para proporciones).**

En la **figura 10** se muestra la cinética de división nuclear obtenido al evaluar las células polinucleadas en personal de enfermería expuesto laboralmente a quimioterapéuticos.



**Figura 10.** Cinética de división nuclear en células **mononucleadas (M)**, **binucleadas (B)**, **trinucleadas (T)**, **tetranucleadas (TE)** y **pentanucleadas (P)** respectivamente en cultivo de linfocitos humanos de personal de enfermería expuesto a quimioterapéuticos. Las barras en color verde representan las células expuestas a los quimioterapéuticos y se comparan con su respectivo control en color rojo. N-control =75 N-expuestos =100.  $p < 0.05$  (Z para proporciones).



**Fig. 11** Microfotografías de células linfocíticas polinucleadas, microscopía de campo claro, 100X.

- (A) Célula mononucleada
- (B) Célula binucleada
- (C) Célula trinucleada
- (D) Célula tetranucleada
- (E) Célula pentanucleada

## 8.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

### Citostaticidad

El ensayo de MNBC permite evaluar el efecto citostático (agente, capaz de inhibir el crecimiento y multiplicación celular) de los agentes quimioterapéuticos mediante el índice de división nuclear (IDN).

En los resultados de citostaticidad **tabla 4, figura 9 y 10** se puede apreciar que el IDN disminuye en todos los tipos de células, pero no resulta ser estadísticamente significativo en comparación con su control.

Los resultados del trabajo para el índice de división nuclear, indican que no hubo cambios significativos, por lo cual es probable que el grado de exposición a estos quimioterapéuticos no sea tan radical para generar una detención a la división nuclear. Sin embargo, otra posibilidad sugiere, que no se pudo mostrar el efecto citostático en el personal de enfermería monitoreado, debido a que el daño fue tan grande que las células iniciaron el proceso de apoptosis y necrosis con el cual mueren de manera natural (apoptosis) o por algún efecto citotóxico (necrosis) y por lo tanto no se observó daño citostático. Se sugiere realizar la lectura de apoptosis y necrosis para confirmar esta posibilidad.

## 9. CONCLUSIONES

- El personal expuesto a quimioterapéuticos, presenta daño en el genoma lo que aumentaría el riesgo de enfermedades cronicodegenerativas.
- Los MN y YN en células mononucleadas se consideró daño antiguo, poseen una relación con el tiempo de exposición y fue el más frecuente. Por lo tanto, los efectos genotóxicos de exposición a quimioterapéuticos se acumulan.
- En células binucleadas, los parámetros MN, PN y YN, se incrementaron de manera significativa en comparación con su control, por lo tanto, la exposición a quimioterapéuticos también genera daño genotóxico reciente.
- El personal de enfermería monitoreado en este estudio presento daño antiguo en células mononucleadas, como daño reciente en células binucleadas.
- El índice de división nuclear, no disminuyo significativamente, por lo tanto, la hipótesis se rechaza.
- Proponer al personal de enfermería que participo en este estudio, que su autocuidado sea eficaz al manejar los quimioterapéuticos.

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la citotoxicidad (apoptosis y necrosis) de la muestra analizada en este trabajo, para optimizar los resultados obtenidos e investigar todos los parámetros que nos ofrece el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.
- Realizar el ensayo de FIHS (Hibridación *in situ* con fluorescencia) a la muestra con daño nuclear elevado.
- Realizar en 3 años el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, al personal de enfermería que obtuvo frecuencias de daño nuclear excesivo.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonassi S., Zein R., Bolognesi C., and Fenech M. (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*. 26:93–100.
- Cooper G. y Housman R. (2002) *La célula* 2<sup>da</sup> edición. Editorial Marban. España.
- Cheong Han S. J. †, Seth Isheetat†, Joiner M.C., and Tucker J.D. (2013) Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 28:433–440.
- Fenech Michael. (1999). Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutation Research*. 428:299-304.
- Fenech Michael. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. 455:81-95.
- Fenech M., Crott J. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridges cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*. 504:131-136.
- Fenech Michael. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “Cytom” assay chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*. 600:58-66.
- Fenech M., Kirsch M., Natarajan A., Surralles J., Crott J., Parry J., Norppa H., Eastmond D., Tucker J. y Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 26:125-132.
- Frías Vázquez Sara, Consecuencias Genéticas del tratamiento antineoplásico. *Oncología pediátrica (conceptos básicos y clínicos)*, Dr. Roberto Rivera Luna. 2002 México. Ed. Intersistemas S.A. de S.V.



- Kirsch V., Bonassi S., Knasmueller S., Holanda N., Bolognesi C., Michael F. (2014). Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for *in vivo* biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals—A HUMN project perspective. *Mutation Research*. 759:49-58.
- Ladeira C., Viegas S., Pádua M., Gomes M., Carolino E., Gomes M.C. (2014) Assessment of genotoxic effects in nurses handling cytostatic drugs. *Journal of toxicology and Environmental Health, Part a: Current Issues*. 77:879-887.
- Lindberg H., Wang X., Jarventaus H., Falck G., Norppa H. y Fenech M. (2007) Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*. 617:33-45.
- Marques D. M. J. (2004) Probabilidad y Estadística. Material para Ciencias Químico Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México - Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. pp. 626.
- Martínez M.T., García F., Hernández M.J., Manzanera J.T., Garrigós J.A. (2002). Los Citostáticos. *Enfermería Global*. Recuperado el 29 de febrero de 2008 y 15 de marzo de 2011.
- Morretti M., Grollino M. G., Pavanello S., Bonfiglioli R., Villarini M., Apolloni M. 2014. Micronuclei and chromosome aberrations in subjects occupationally exposed to antineoplastic drugs: a multicentric approach. *BMC Public Health*. 195:11.
- Nefic H. y Handzic I. (2013). The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutation Research*. 753:1-11.
- Rekhadevi P. V., Sailaja N., Chandrasekhar M., Rahaman M. F., Paramjit G. 2007. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis*. 22:396-401.
- Rodríguez M.T., Valdés Y.C., Proveyer D.S. (2004) Citostáticos: medicamentos riesgosos. *Revista Cubana de Medicina*.
- Serrano G.L., Montero M.R. (2001) Micronuclei and chromatid buds are result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 38:38-45.
- Sorsa M, Hamella M, Jarviluoma E. (2006) Handling anticancer drugs: from hazard identification to risk management? *Ann N Y Acad Sci*. 1076:628-34

- Terradas M., Martín M., Tusell L., Ganesca A. (2010) Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*, 705:60-67.
- Weidner M.S. and Erdtmann B. (2000) Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 471:21-27.
- Witt K.L., Bishop J.B. (1996) Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. *Mutation Research*. 355:209-234.
- Zalacain M., Serrasesúmaga L., Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Sis San Navarra*. 28, (2), 227-236.

## 12. ANEXOS

### ANEXO I PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE MNBC

**Citocalasina-B (SIGMA U.S.A.):** disolver el contenido del vial (5 mg) en 1.6 ml de dimetilsulfóxido (stock 1), extraer 100 µl de stock 1 y se le agrega 900 µl de agua inyectable (stock 2). Del stock 2, extraer 100 µl y adicionarlos a 5 ml de medio de medio de cultivo, para tener una concentración final de 6 µl/ml. Esterilizar con un filtro con poro 0.02 µm y tanto el stock 1 como en stock 2 se almacenan en congelación.

**Lectina PHA-M (SIGMA U.S.A.):** disolver el contenido del vial (5mg) en 10 ml de agua inyectable y almacenar en refrigeración. Se adicionan 0.25 ml por cada 5 ml de medio de cultivo.

**Metanol – ácido acético (3:1) (J. T. Baker, México):** se divide el total de mililitros a preparar, entre 4, para obtener la proporción del ácido acético, el resto es la proporción del metanol.

**Metanol – ácido acético (85:15) (J. T. Baker, México):** para 100 ml de fijador con 85 ml de metanol y 15 ml de ácido acético.

**May-Grünwald (SIGMA U.S.A.):** por cada 2 mililitros de May-Grünwald, se agrega uno de agua destilada. Se divide el total de mililitros entre 3, para obtener la proporción de agua destilada y el restante es el colorante.

**Giemsa (1:10) (SIGMA U.S.A.):** se diluye 1 ml de colorante en 20 ml de agua desionizada.

**ANEXO II CONSENTIMIENTO INFORMADO, PERSONAL NO EXPUESTO A QUIMIOTERAPÉUTICOS.**



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**  
**CAMPUS CELAYA – SALVATIERRA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD E INGENIERÍAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA**

***CONSENTIMIENTO INFORMADO, PERSONAL NO EXPUESTO***

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

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

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

Me fue dado a conocer el objetivo de la investigación el cual consiste en: analizar el autocuidado en la preparación y manejo de citostáticos y su relación con genotoxicidad en el personal de enfermería, sin embargo, como el estudio es epidemiológico de casos y controles, he sido seleccionada dentro del grupo no expuesto para participar en dicha investigación en virtud de que

de cumpla con los requisitos necesarios para la misma. También se me ha informado sobre el derecho que poseo de que aún, después de que se haya iniciado la investigación, puedo declinar a continuar en la misma, sin que esto tenga repercusiones en mi persona.

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

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

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

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

Se me ha avisado que los beneficios que obtendrá el personal de enfermería expuesto con la realización del estudio, es la detección de genotoxicidad y que se pretende gestionar con las autoridades competentes, rotaciones frecuentes del personal que prepara y maneja citostáticos, para con ello, disminuir la presencia de dicha condición, además, incidir en relación a la mejora de las condiciones ambientales y de la dotación de material y equipo ideales para dichos fármacos. Me han explicado que los datos obtenidos serán custodiados por el investigador responsable de la

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

---

Nombre y firma de la entrevistada

---

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

---

Nombre y firma del testigo

---

Nombre y firma del testigo

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

**ANEXO III CONSENTIMIENTO INFORMADO, PERSONAL EXPUESTO A QUIMIOTERAPÉUTICOS.**

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO CAMPUS CELAYA – SALVATIERRA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD E INGENIERÍAS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA**

***CONSENTIMIENTO INFORMADO, PERSONAL EXPUESTO***

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

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

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

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

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

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

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

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

Se me ha avisado que los beneficios que obtendrá el personal de enfermería con la realización del estudio, es la detección de genotoxicidad y que se pretende gestionar con las autoridades competentes, rotaciones frecuentes del personal que prepara y maneja citostáticos, para con ello, disminuir la presencia de dicha condición, además, incidir en relación a la mejora de las condiciones ambientales e institucionales, así como de la dotación de material y equipo ideales para la preparación y manejo de dichos fármacos.

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



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

---

Nombre y firma de la entrevistada

---

ME. Ma. Lilia Alicia Alcántar Zavala

Responsable de la investigación

---

Nombre y firma del testigo

---

Nombre y firma del testigo

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

## ANEXO IV. CUESTIONARIO APLICADO A LAS ENFERMERAS QUE MANIPULAN QUIMIOTERAPÉUTICOS.

Evaluación del Autocuidado en la Preparación y Manejo de citostáticos  Aspectos a evaluar	Cubrebocas			Guantes			Gafas		Bata			Uso gorro o turbante		
	No utiliza	Desechables	Con filtro (FFP3)	No utiliza	Desechables	Látex Qx.	Nitrilo	Sí	No	No utiliza	Impermeable	Algodón	Sí	No
1. ¿Durante la preparación de citostáticos qué utiliza?														
2. ¿Para la administración de citostáticos reconstituidos qué emplea?														
3. ¿Para el traslado de citostáticos reconstituidos qué utiliza?														
4. ¿Qué emplea para el cambio de ropa de cama?														
5. ¿En caso de derrames de citostáticos y limpiar la zona qué utiliza?														
6. ¿Cuándo coloca un cómodo u orinal qué emplea?														
7. ¿En caso de cambio de pañal, que usa?														
8. ¿Para la extracción del aire que se forma durante la dilución de citostáticos qué utiliza?	Nada			Gasa humedecida con agua			Gasa humedecida con Alcohol		Gasa seca					

9. ¿Si durante la preparación de citostáticos se le contaminan los guantes, qué procedimiento sigue?	Lava los guantes	No los cambia	Cambio de guantes
10. ¿Para trasladar citostáticos preparados, ¿qué utiliza?	Mesa Pasteur	Charla de mayo	Los lleva en la mano

Del siguiente cuadro de medicamentos marque con una X la respuesta que corresponda

NOMBRE DEL FÁRMACO	SÍ ES QUIMIOTERAPÉUTICO	NO ES QUIMIOTERAPÉUTICO	NO SÉ
1. Ácido fólico			
2. Actinomicina			
3. Bleomicina			
4. Carboplatino			
5. Ciclofosfamida			
6. Cisplatino			
7. Citarabina			
8. Dactinomicina			
9. Dolasetron			
10. Doxorrubicina			
11. Epirubicina			
12. Etoposido			
13. Filgastrin			
14. Fluoruracilo			
15. Ifosfamida			
16. Mesna			
17. Metotrexato			
18. Mitomicina			
19. Ondansetron			
20. Vincristina			

## **ANEXO V. PARTICIPACIÓN ACADÉMICA**

- **Reconocimiento: Jóvenes hacia la investigación, noviembre 2012.**
- **Congreso Nacional de Genética, Manzanillo Colima octubre 2013. Presentación de trabajo libre (oral): MICRONÚCLEOS Y DAÑO NUCLEAR EN LINFOCITOS DE ENFERMERAS EXPUESTAS A CITOSTÁTICOS.**
- **XLVI Curso Anual Teórico-Práctico de Genética Humana, Julio 2014.**

La Dirección General de Divulgación de la Ciencia

mediante el programa

## Jóvenes hacia la Investigación

Otorga a la

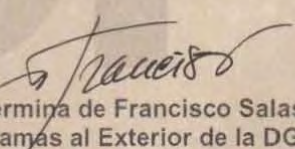
**Biól. Cinthia Briseño Gómez**

de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
el presente

### RECONOCIMIENTO

por el apoyo brindado a los alumnos **Óscar Jair Vázquez Ciro** y **Roberto Cruz Castañeda** de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, los cuales realizaron bajo su asesoría y supervisión, su **Estancia Corta de Investigación** del 4 al 29 de junio del presente año.

Encomiamos su dedicada y valiosa participación, la que reedita en beneficio de los jóvenes participantes del programa, incentivando su interés por la ciencia.

  
Biól. Guillermina de Francisco Salas  
Jefa de Programas al Exterior de la DGDC

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, D. F. a 23 de noviembre de 2012





Sociedad Mexicana de Genética AC  
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
Universidad de Colima



# CONSTANCIA

Otorgan la presente  
A

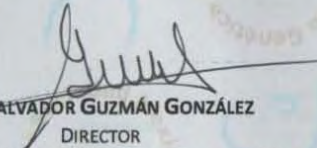
**BRISEÑO GÓMEZ CYNTHIA ANAYELLI**

**BRISEÑO GÓMEZ CYNTHIA ANAYELLI**

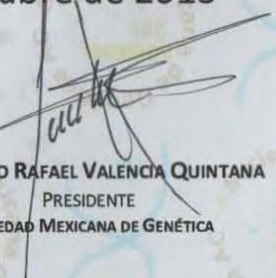
POR SU PARTICIPACIÓN Y ASISTENCIA AL

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013**

Manzanillo, Colima del 2 al 4 de octubre de 2013

  
**DR. SALVADOR GUZMÁN GONZÁLEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
UNIVERSIDAD DE COLIMA

  
**DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA**  
PRESIDENTE

SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA





**LA ASOCIACIÓN MEXICANA  
DE GENÉTICA HUMANA, A. C.**

Otorga la presente

# CONSTANCIA

a

**Cynthia Anayelli Briseño Gómez**

Por su asistencia al **XLVI Curso Anual Teórico-Práctico de Genética Humana**,  
con una duración de 40 horas, llevado a cabo en el  
Auditorio de la Coordinación de Investigación en Salud del  
Centro Médico Nacional Siglo XXI

México, D. F. a 4 de julio de 2014

DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA  
Presidente AMGH

DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS  
Secretaria AMGH

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ  
Tesorera AMGH

DRA. NANCY MONROY JARAMILLO  
Vocal Centro I AMGH

Coordinadores