

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE MARCADORES
GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO
DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A
DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL
CALZADO**

TESIS DOCTORAL

LORETO PITALUGA POVEDA

2017

Directores:

**Dra. María José Prieto Castelló
Dr. Antonio Cardona Llorens**



DETERMINACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

LORETO PITALUGA POVEDA

2017

Directores de tesis:

**Dra. María José Prieto Castelló
Dr. Antonio Cardona Llorens**

San Juan de Alicante 2017

DÑA. SUSANA JIMÉNEZ MORENO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE.

CERTIFICA:

Que Dña. Loreto Pitaluga Poveda ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de tesis doctoral titulada DETERMINACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo de forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al grado de doctor.

Lo que certifico en Sant Joan d'Alacant a 21 de junio de dos mil diecisiete.

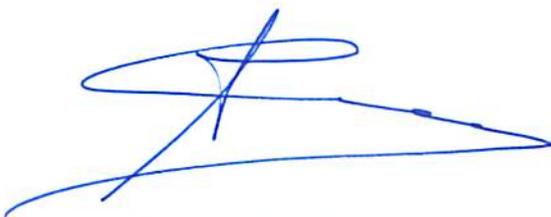
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Susana Jimenez', with a large, sweeping flourish extending from the end of the signature.

D. Antonio Cardona Llorens y Dña. María José Prieto Castelló,
como Directores de la Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado DETERMINACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO realizado por Dña. Loreto Pitaluga Poveda ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Lo que certificamos en Sant Joan d'Alacant a 21 de junio de dos mil diecisiete.



D. Antonio Cardona Llorens



Dña. María José Prieto Castelló

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III, a través de su Programa de Ayudas para la realización de proyectos de investigación en el marco del Plan Nacional de I+D+i, dentro del Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud del Ministerio de Ciencia e Innovación (2011-2013)

A Ferran, mi marido, mi compañero y mi amigo, que siempre me ha acompañado en todos los buenos y malos momentos, y que sin su apoyo, esta tesis no habría visto la luz.

A mis hijos, Jaume y Roger, y a mi nieto Diego, que dan sentido a mi vida y que siempre están en mi corazón.

A mis padres que me dieron vida, educación, apoyo y consejos.

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento más especial a mi directora de tesis, Dra. D^a. Maria José Prieto Castelló, que me ha guiado y orientado en el largo camino que ha supuesto el trabajo que culmina con la elaboración, presentación y defensa de esta tesis doctoral. Gracias por su amistad a lo largo de todos estos años.

Al Dr. D. Antonio Cardona Llorens, por la confianza que me ha demostrado al acogirme como colaboradora en el área de Medicina Legal y Forense, hace ya 9 años y por su amistad desde hace más de 30 años.

A la Dra. D^a Maria Dolores Marhuenda Amorós, por su cariño y apoyo incondicional.

A D^a Nadia Snacel Sánchez por su colaboración desinteresada.

Jamás podré agradecerlos lo suficiente, el haber estado a mi lado y haberme dado fuerzas para seguir, durante uno de los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por vuestra sincera amistad y apoyo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ACGIH:** American Conference of Governmental Industrial Hygienists
- AIHA:** American Industrial Hygiene Association
- AINEs:** fármacos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos no esteroideos
- Ala:** Alanina
- ALDH2:** enzima aldehído deshidrogenasa
- Alw261:** endonucleasa de restricción
- ANOVA:** análisis de la varianza
- API:** American Petroleum Institute
- Atm:** atmósfera, unidad de presión
- ATP:** Adenosin tri fosfato
- BATs:** Valores Biológicos de Tolerancia
- BEI:** Índice de Exposición Biológica
- bp:** Pares de bases
- Buffer BR (1,2,3,4,5):** Tampones utilizados en la técnica de purificación de ARN
- °C:** Grado centígrado
- CA:** Aberraciones cromosómicas
- cal/g:** calorías por gramo
- CBMN:** cytokinesis-block micronucleus. Ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis
- CBN:** células bi nucleadas
- CCOO:** Comisiones Obreras
- cDNA:** hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado
- Chromosorb W-AW:** Tipo de soporte utilizado en columnas de cromatografía de gases.
- CEIE:** Comisión de ética en la investigación experimental
- cm:** centímetro
- CMR:** Razón metabólica clorzoxazona

COVs: Compuestos orgánicos volátiles

Creat.: creatinina

CSAT: cycle standard amplitude temperaturas. Programa de PCR con un ciclo estándar con amplio rango de temperaturas

CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C11, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4: Genes pertenecientes a la superfamilia del Citocromo P450

CYP450: Enzima Citocromo P450

CZX: Clorzoxazona

C3H/HeJ: tipo de ratones utilizados en investigación

D.F.G: Deutsche Forschungsgemeinschaft

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNA-PAHs: aductos de DNA y hidrocarburos aromáticos policíclicos

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato

Dral: Endonucleasa de restricción Dral

DS: desviación estandard

DT-diaforasa: enzima que reduce quinonas a hidroquinonas en el ciclo redox

dUTP: Trifosfato de deoxiuridina

EC: Exposición de corta duración

ED: Exposición diaria

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPA: Environmental Protection Agency (agencia de protección medioambiental)

EPIs: equipos de protección individual

ESR assesment: environmental science and research assesment. Evaluación de la investigación en ciencias ambientales.

EROs: especies reactivas de oxígeno. Radicales libres

FFAP: tipo de relleno para columnas capilares en cromatografía de gases

FID: Detector de ionización de llama en cromatografía de gases

FISH: Hibridación in situ con fluorescencia

FMO: grupo de enzimas flavin monooxigenasas

g/mol: Gramos por mol

GC: Cromatografía de gases

GSEC: Susceptibilidad genética a carcinógenos ambientales.

GSH. Glutation

GST: Superfamilia de las Glutación S-transferasas

GSTM1, GSTT1, GSTP1: Genes polimórficos de la superfamilia de las Glutacion S-transferasas

2,5-HD: 2,5-hexanodiona

HA: Hippuric acid. Acido hipúrico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia o Cromatografía líquida de alta resolución

HSDB: Hazardous substances data bank. Base de datos de toxicología

HUMN: International human Micronucleus Project. Estudio internacional sobre daño en el DNA de la población humana.

IARC: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer

IDLH: Immediately dangerous to life or health. Atmósfera que puede causar efectos adversos irreversibles para la salud.

Ile: Isoleucina

INSHT: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

K: grados Kelvin

Kb: Kilobases

Kcal: Kilocaloria

Kcal/mol: kilocalorías por mol. Unidades de calor de vaporización.

KCl: Cloruro potásico

kPa: KiloPascal.

l: Litro

l/mol: litros por mol

LC50: concentración letal 50

LD50: dosis letal 50

LDLo: dosis letal mínima. Dosis más baja de un tóxico en la que se produce la muerte del animal de experimentación.

LOAEL: Lowest observed adverse effect level. Índice de toxicidad determinado en el proceso de evaluación toxicológica

m: Metro

m³: Metro cúbico

M: Molar

MA: Ácido mandélico

MAC: Maximun Allowable Concentration (Concentración Máxima Permisible)

MAK: Maximale Arbeitsplatz-Konzentration

MEK: Metiletilcetona

MBS: Metilmetacrilato-butadieno-estireno

mcg: microgramo

mcl: microgramo

mg: Miligramo

mHA: methil hippuric acid. Ácido metil hipúrico

min: Minuto

ml: Mililitro

mm: Milímetro

mM: milimolar

mm Hg: milímetros de mercurio

MN: Micronúcleo

mN/m: Mili Newton por metro (medida de tensión superficial)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MS: Espectrometría de masas

NaCl: Cloruro sódico

nd: no detectado

NEcalibrador: nivel de expresión del calibrador

ng: nanogramo

NIOSH: National institute for occupational and safety health. Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (EEUU)

NOAEL: no observed adverse effects level. Es un índice de toxicidad que se determina en el proceso de evaluación toxicológica

NTP: Nota Técnica de Prevención

8-OHdG: (-hidroxi desoxi guanosina)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio

OSHA: Occupational safety and health administration. Administración de seguridad y salud ocupacional. Organismo de EEUU

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PASW: programa informático estadístico (SPSS)

PBL: Peripheral blood lymphocyte. Linfocitos de sangre periférica

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PBTK: Physiologically-based toxicokinetic. Toxicocinética de base fisiológica

PCR: Reaccion en cadena de la polimerasa, (polimerase chain reaction)

PGA: Ácido fenilglioxílico

pmol: picomol

ppm: Partes por millón

PstI: Endonucleasa de restricción PstI

RD: Real Decreto

RFLP-PCR: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI. Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute, utilizado en cultivos celulares

RQ: respiratory quotient. Utilizado en cálculos de metabolismo basal

RsaI: Endonucleasa de restricción RsaI

RT-PCR: Reacción de la polimerasa en cadena a tiempo real

SCE: Intercambio de cromátidas hermanas

SGCE: electroforesis en gel, de una sola célula.

SIM: monitoreo selectivo de iones. Modo de adquisición de datos en cromatografía de gases.

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

STEL: Short-Term Exposure Limit, concentración que no debe superarse en ningún momento de la jornada de trabajo.

SSB: single-stranded DNA binding proteins (proteínas ligantes de ADN de cadena sencilla)

SSCP: Single Stranded Conformational Polymorphism. Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple.

SDS, SLS: Dodecilsulfato sódico ó Laurilsulfato sódico

TDI: diisocianato de tolueno

TLV: Valor Límite Umbral

TLV-TWA: Threshold Limit Value-Time Weighted Average (Valor Límite Umbral-Media Ponderada en el Tiempo)

TLV-STEL: Threshold Limit Value-Short Term Exposure Limit (Valor Límite Umbral-Límite de Exposición de Corta Duración)

TLV-C: Threshold Limit Value-Ceiling (Valor Límite Umbral-Techo)

TNT: (2,4,6 trinitro tolueno)

TOXNET: Toxicology Data Network. Bases de datos de toxicología

TSO: óxido de trans-estil benceno.

UDP-glucuronil transferasa: enzima hepática que cataliza la unión de la bilirrubina con el ácido glucurónico.

UNE-EN: conjunto de normas tecnológicas creadas por los comités técnicos de normalización

UPE: Poliésteres insaturados

UIDOC: gel documentation systems. Obtiene y descarga imágenes del trabajo realizado en el laboratorio.

UV: Ultravioleta

Val: Valina

VLA-EC: Valor Límite Ambiental-Exposición de Corta Duración

VLA-ED: Valor Límite Ambiental-Exposición Diaria

VLB: Valor límite biológico

WHO: World Health Organisation (Organización Mundial de la Salud)

Wt: Genotipo Wild type ó Genotipo silvestre

µg: Microgramo

µL: Microlitro

ÍNDICE DE CONTENIDOS



1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de los disolventes orgánicos	3
1.2. Toxicocinética y efectos tóxicos de los disolventes orgánicos	8
1.2.1. Absorción	11
1.2.2. Distribución	13
1.2.3. Metabolismo o Metabolización	14
1.2.3.1. Principales enzimas de metabolización.....	18
1.2.3.1.1. Enzimas de fase I.....	18
1.2.3.1.2. Enzimas de fase II.....	22
1.2.4. Eliminación	25
1.3. Toxicodinamia. Efectos de los agentes químicos	27
1.4. Tolueno, xileno y hexano en la industria del calzado	29
1.4.1. Tolueno	29
1.4.1.1. Generalidades, usos , propiedades.....	29
1.4.1.2. Toxicocinética	32
1.4.1.3. Toxicodinamia.....	37
1.4.1.4. Efectos tóxicos.....	38
1.4.1.5. Estudios de toxicidad	39
1.4.2. Xileno	41
1.4.2.1. Generalidades, usos , propiedades	41
1.4.2.2. Toxicocinética.....	45
1.4.2.3. Toxicodinamia	48
1.4.2.4. Efectos tóxicos	49
1.4.2.5. Estudios de toxicidad.....	50
1.4.3. n-hexano	51
1.4.3.1. Generalidades, usos , propiedades	51
1.4.3.2. Toxicocinética	54
1.4.3.3. Toxicodinamia	59

1.4.3.4.	Efectos tóxicos	61
1.4.3.5.	Estudios de toxicidad.....	63
1.5.	El control ambiental y el control biológico en la valoración de riesgos de exposición laboral a disolventes	64
1.5.1.	<i>El control ambiental</i>	66
1.5.1.1.	Valores límite de e,xposición ambiental para tolueno, xileno, n-hexano	72
1.5.1.1.1.	Tolueno. Valores límite de exposición	72
1.5.1.1.2.	Xileno. Valores límite de exposición.....	73
1.5.1.1.3.	N-hexano. Valores límite de exposición.....	73
1.5.2.	<i>El control biológico</i>.....	74
1.5.2.1.	Valores límites biológicos para tolueno, xileno, n-hexano	82
1.5.2.1.1.	Tolueno. Vlb's	82
1.5.2.1.2.	Xileno. Vlb's.....	83
1.5.2.1.3.	N-hexano. Vlb's.....	83
1.5.2.2.	Ventajas y limitaciones del control biológico.....	84
1.6.	Técnicas de estudios toxicogenéticos	85
1.6.1.	<i>Análisis de PCR(reacción en cadena de la polimerasa)</i>.....	86
1.6.2.	<i>Técnica del análisis de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (CBMN)</i>	89
1.7.	Justificación	90
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	93
2.1.	Hipótesis.....	95
2.2.	Objetivos	95
2.2.1.	<i>Objetivo general</i>	95
2.2.2.	<i>Objetivos específicos</i>	96
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	99
3.1.	Diseño de la investigación y plan de trabajo	101

3.1.1. Selección de la muestra	102
3.2. Metodología	105
3.2.1. Control higiénico-clínico	106
3.2.2. Control ambiental	108
3.2.2.1 Técnicas de muestreo	108
3.2.2.2. Método analítico	108
3.2.3. Control biológico de los disolventes. Cuantificación de los disolventes detectados en el ambiente de trabajo	109
3.2.3.1. Método de cuantificación de 2,5-hexanodiona	109
3.2.3.2. Método de cuantificación de ácido hipúrico e isómeros de metil - hipúrico.	110
3.2.4. Método de análisis de los polimorfismos más comunes de las enzimas CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, en muestras de mucosa bucal recogidas mediante frotis de mejilla.	111
3.2.4.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	112
3.2.4.2. Genotipado de CYP2E1.....	113
3.2.4.2.1. Genotipado de CYP2E1 alelo 5B	113
3.2.4.2.2. Genotipado de CYP2E1 alelo 6.....	115
3.2.4.3. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTM1	118
3.2.4.4. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTT1	121
3.2.4.5. Genotipado del polimorfismo RS 1695 Ile105val del gen GSTP1	123
3.2.5. Método de cuantificación a tiempo real del m-RNA de CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, mediante RT-PCR en muestras de sangre	125
3.2.5.1. Purificación del ARN celular a partir de sangre total obtenida en los tubos Paxgene para ARN.....	126
3.2.5.2. Reacción de retrotranscripción.....	127
3.2.5.3. Cuantificación mediante real time-PCR.....	128
3.2.6. Análisis de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica	130
3.2.6.1. Procesamiento de los cultivos para análisis de micronúcleos	130
3.2.6.2. Técnica de análisis de micronúcleos en células binucleadas (CBMN)	130

3.3. Tratamiento estadístico de los datos	132
3.3.1. Estadística básica	132
3.3.2. Comparación de medias	133
3.3.3. Matrices de correlación	133
4. RESULTADOS	135
4.1. Control higiénico-clínico	137
4.1.1. Resultados de la encuesta realizada a los trabajadores	137
4.2. Resultados del control ambiental	141
4.3. Resultados del control biológico	142
4.4. Análisis de los polimorfismos estudiados de los genes CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1	145
4.4.1. Resultados de la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de frotis de mucosa bucal	145
4.4.2. Genotipado de CYP2E1	145
4.4.2.1. Genotipado de CYP2E1 alelo 5B	145
4.4.2.2. Genotipado de CYP2E1 alelo 6.....	147
4.4.3. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTM1	149
4.4.4. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTT1	150
4.4.5. Genotipado del polimorfismo RS1695 Ile105val del gen GSTP1	151
4.4.6. Resultados del genotipado de los genes CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en las muestras de mucosa yugal de trabajadores expuestos y controles	152
4.5. Resultados de los niveles de expresión de CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en las muestras de sangre analizadas	154
4.6. Resultados del análisis de micronúcleos en las muestras de trabajadores expuestos y controles	156
4.7. Resultados de las relaciones de los indicadores biológicos con las concentraciones de disolventes en el ambiente. Valoración de la	

influencia de los factores ocupacionales y extraocupacionales en los niveles de los indicadores biológicos.	157
4.7.1. <i>Relación entre concentraciones ambientales de tolueno, xileno y n-hexano y los indicadores biológicos en orina</i>	157
4.7.2. <i>Influencia de factores ocupacionales y extraocupacionales en los niveles de los indicadores biológicos</i>	158
4.8. Estudio de la influencia de las variables recogidas en la historia clínico-laboral, en los niveles de expresión de las enzimas y la tasa de micronúcleos.	161
4.8.1. <i>Relación entre el genotipado y fenotipado de las enzimas estudiadas</i> ..	161
4.8.2. <i>Relación entre los polimorfismos estudiados con los niveles de indicadores biológicos</i>	164
4.8.3. <i>Relación entre los polimorfismos de las enzimas estudiadas y la frecuencia de micronúcleos (CBMN)</i>	165
4.8.4. <i>Relación entre la tasa de micronúcleos y las variables recogidas en la historia higiénico clínica</i>	166
4.8.5. <i>Influencia de las variables recogidas en la historia clínica y los niveles de expresión de las enzimas.</i>	168
5. DISCUSIÓN	169
5.1. Descripción general del grupo de trabajadores expuestos. Control ambiental y biológico	171
5.2. Genotipado de polimorfismos genéticos a partir de muestras de mucosa bucal	177
5.2.1. <i>Frotis de mucosa bucal</i>	177
5.2.2. <i>Frecuencias de los polimorfismos estudiados</i>	178
5.3. Niveles de expresión de los genes CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 a partir de sangre total.	193
5.4. Análisis de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica	198
5.5. Relación de los polimorfismos de los genes de metabolización estudiados, con sus niveles de expresión y los indicadores biológicos	204

5.6. Relación entre la frecuencia de micronúcleos con los polimorfismos, indicadores biológicos y las variables recogidas en la historia clínica.	208
6. CONCLUSIONES	213
7. BIBLIOGRAFÍA	219
8. ANEXOS	255
I. Hoja de información al voluntario expuesto.....	257
II. Formulario de consentimiento informado por escrito. Voluntario expuesto.....	261
III. Cuestionario disolventes. Trabajadores expuestos.....	262
IV. Hoja de información al voluntario no expuesto.....	271
V. Formulario de consentimiento informado por escrito. Trabajadores no expuestos.....	275
VI. Cuestionario disolventes. Trabajadores no expuestos.....	276

1. INTRODUCCIÓN



1.1. GENERALIDADES DE LOS DISOLVENTES ORGÁNICOS. USOS

Los disolventes son los productos químicos industriales de mayor uso, producidos y utilizados en grandes cantidades, bajo una gran variedad de denominaciones comerciales y químicas, en casi todas las industrias. Son innumerables tanto sus aplicaciones como la variedad de sustancias utilizadas como disolventes. Se estima que en el mercado europeo existen actualmente unas 100.000 sustancias químicas diferentes, de las cuales 10.000 se comercializan en cantidades superiores a las 10 toneladas. Los primeros disolventes utilizados fueron los hidrocarburos derivados del petróleo y alcoholes.

Los disolventes industriales más utilizados en la industria son **disolventes orgánicos**, que se definen como todo "Compuesto Orgánico Volátil" (VOCs) que se utilice sólo o en combinación con otros agentes, sin sufrir ningún cambio químico, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, o se utilice como agente de limpieza para disolver la suciedad, o como disolvente, o como medio de dispersión, o como modificador de la viscosidad, o como agente tensioactivo, plastificante o protector (Real Decreto 117/2003 de 31 de enero, sobre limitación de emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes en determinadas actividades).

Muchos VOCs son peligrosos para el medio ambiente y para la salud humana, por ese motivo se han creado restricciones en su uso, como refleja el Protocolo de Montreal diseñado para proteger la capa de ozono reduciendo la producción y el consumo de numerosas sustancias que se ha estudiado que reaccionan con el ozono. (Protocolo de la Convención de Viena para la Protección de la Capa de Ozono, 2006).

También en el ámbito laboral, organismos como la American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) y en España el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), han propuesto valores límite para su utilización en la valoración de riesgos de exposición de trabajadores a estos agentes mediante técnicas de control ambiental y biológico. El ciclo de los VOCs se inicia con la extracción de los productos en la naturaleza (a partir del petróleo), continúa con la elaboración y fabricación, pasando a su utilización y se termina con su eliminación al finalizar su periodo útil.

Los disolventes orgánicos industriales presentan las siguientes características principales:

- Líquidos de bajo peso molecular
- Poco polares y por tanto, escasamente miscibles en agua, manifestando una gran lipofilia
- Poseen gran volatilidad por lo que presentan una alta presión de vapor, pudiendo pasar fácilmente a la atmósfera en forma de vapor durante su manejo, y por ello, son susceptibles de ser inhalados fácilmente
- Tienen puntos de ebullición relativamente bajos
- Generalmente son varios compuesto químicos mezclados acompañados de trazas de otros.
- Uso muy amplio y diverso
- Su composición puede variar con el tiempo debido a su volatilidad, presión de vapor y contaminación con el uso.
- En general, producen importantes efectos tóxicos
- Pueden dar lugar a mezclas inflamables con riesgo de explosión

Los disolventes orgánicos, se clasifican en familias según el grupo químico al que pertenecen. La clasificación se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 1. Familias de disolventes orgánicos. Disolventes más comunes de cada familia.

FAMILIAS DE DISOLVENTES	DISOLVENTES MÁS UTILIZADOS
Hidrocarburos alifáticos	Pentano, hexano, heptano, decano y otros hidrocarburos saturados
Hidrocarburos aromáticos	Benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, estireno
Hidrocarburos alicíclicos	Ciclohexano, metilciclohexano, (alfa-pineno), terpenos (trementina), pinenos
Hidrocarburos halogenados	Cloruro de metileno, tricloroetileno, cloroformo, percloroetileno, tetracloroetileno, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, freones, 1,1,1-tricloroetano
Alcoholes	Metanol, etanol, isopropanol, butanol
Glicoles	Etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol
Éteres	2-metoxietanol, etoxietanol, butoxietanol, p-dioxano
Éteres de glicol	Éter monoetílico de etilenglicol (cellosolve), éter monometílico de etilenglicol (metilcellosolve)
Ésteres	Acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, acetato de i-butilo, acetato de 2-etoxietilo, metacrilato de metilo
Ésteres de ácidos grasos	Ésteres de aceite de coco, ésteres de aceite de colza
Cetonas	Acetona, butanona-2, 4-Metil-pentanona-2, hexanona-2, ciclohexanona, metiletilcetona
Terpenos	a-pineno, et-limoneno
Ácidos orgánicos	Ácido acético, ácido oxálico
Otros	Nitroparafinas, disulfuro de carbono, óxido de estireno
Mezclas complejas de composición variable	Disolvente Stoddard, gasolina, white spirit, naftas

Fuente: Mancheño e Izquierdo 2008.

Las propiedades más importantes a tener cuenta en la elección de un disolvente (o mezcla de disolventes) son:

1. su poder disolvente
2. las propiedades de flujo y humectación
3. su velocidad de evaporación
4. su inflamabilidad (temperatura a partir de la cual una sustancia arde si se le aplica una llama) y
5. su toxicidad

El disolvente casi siempre realiza una de las dos funciones siguientes:

- Realizar un proceso de separación al disolver selectivamente un material de una mezcla
- Ser auxiliar en el proceso de fabricación de un material (pintura u otro material polimérico) al disminuir su viscosidad.

Así, los disolventes orgánicos se utilizan solos o en combinación con otros agentes para disolver materias primas, productos o materiales residuales, utilizándose para la limpieza, para modificar la viscosidad, como agente tensioactivo, como plastificante, como conservante o como portador de otras sustancias que, una vez depositadas, quedan fijadas evaporándose el disolvente. En general, los disolventes orgánicos son de uso corriente en las industrias para pegar, desengrasar, limpiar, plastificar y flexibilizar, pintar y lubricar. La mayoría de ellos contienen VOCs que se evaporan fácilmente, son inflamables y pueden disolverse en grasas, por lo que el riesgo de exposición laboral y medioambiental durante su utilización es muy elevado.

Las principales actividades, los procesos donde se usan y los tipos de disolventes utilizados se describen en el cuadro siguiente:

Tabla 2. Disolventes utilizados en diversos procesos industriales

TIPO DE ACTIVIDAD	PROCESO	PRINCIPALES DISOLVENTES
Alimentaria	Extracción de aceites y grasas	Hexano, ciclohexano y Sulfuro de Carbono
Siderurgia	Limpieza y desengrase de piezas. Refrigeración en proceso de corte	Tricloroetileno y cloruro de metileno. Xilenos Hidrocarburos alifáticos
Calzado	Disolventes de colas y pegamentos	n-Hexano, tolueno
Plásticos y caucho	Disolvente de materias primas y de transformación	Dimetilformamida, xileno, cloroformo y acetona
Madera	Disolvente de lacas y barnices	Trementina y tolueno
Cosmética	Dispersante	Alcohol etílico, alcohol isopropílico, cloroformo
Pinturas	Diluyente	Tolueno, xileno, acetatos, cetonas
Limpieza en seco	Disolvente de sustancias orgánicas	Tetracloroetileno
Artes gráficas	Solución de mojado, limpieza de equipos y rodillos. Diluyente de las tintas del fotograbado	Alcohol isopropílico Tolueno

Fuente: Mancheño e Izquierdo 2008.

Estos disolventes forman parte de los procesos de fabricación de muchos productos que se utilizan de forma generalizada, de hecho son los solventes de uso más intensivo en la industria. En un estudio sobre prevención y control de agentes químicos realizado por la secretaría de Salud Laboral de CCOO de Madrid se observó cómo, de los seis productos más utilizados en la industria, cinco eran disolventes: tolueno, xileno, acetona, formaldehído y metanol (2008).

1.2. TOXICOCINÉTICA Y EFECTOS TÓXICOS DE LOS DISOLVENTES

El proceso de penetración de un tóxico desde el medio ambiente hasta los lugares en que va a producir su efecto tóxico dentro del organismo puede dividirse en tres fases (Djuric 2001).

1. La fase de exposición, que comprende todos los procesos que se producen entre diversos tóxicos y/o la influencia que tienen sobre ellos los factores ambientales (luz, temperatura, humedad, etc.). Los tóxicos pueden sufrir transformaciones químicas, degradación, biodegradación (por microorganismos) y desintegración.

2. La fase toxicocinética, que comprende la absorción de los tóxicos en el organismo y todos los procesos subsiguientes: transporte por los fluidos corporales, distribución y acumulación en tejidos y órganos, biotransformación en metabolitos y eliminación del organismo (excreción) de los tóxicos y/o metabolitos.

3. La fase toxicodinámica, que se refiere a la interacción de los tóxicos (moléculas, iones, coloides) con lugares de acción específicos en las células o dentro de ellas —receptores—, con el resultado último de un efecto tóxico.



Figura 1. Fases y características del fenómeno tóxico. Fuente Angel 2009

El efecto de un tóxico depende de la concentración del mismo en el órgano diana, es decir, el lugar selectivo donde ejercen su acción. La concentración alcanzada en el órgano diana depende, a su vez, del proceso toxicocinético o conjunto de procesos mediante los que el organismo actúa sobre la sustancia tóxica que se resume en los siguientes pasos:

- ✓ Absorción
- ✓ Distribución
- ✓ Biotransformación o metabolismo
- ✓ Eliminación

Si la fracción absorbida del producto químico es pequeña o la velocidad de absorción es baja, es de esperar, obtener sólo una pequeña concentración del mismo en el órgano diana y por lo tanto, en este caso, no resultaría significativamente tóxico. De igual forma, la distribución de los productos químicos en el cuerpo influye en su toxicidad; si éstos se concentran en un órgano distinto al órgano diana, contribuiría a disminuir su toxicidad.

La biotransformación, afecta también marcadamente la toxicidad de muchos productos químicos. La biotransformación, puede resultar en la formación de una sustancia menos tóxica o más tóxica. El proceso de biotransformación por el organismo y su velocidad, son factores importantes en la determinación de la concentración del tóxico encontrado en el órgano diana. Por supuesto, cuanto más rápido sea eliminado un producto químico del organismo, menor será su concentración en el órgano diana, resultando así menos tóxico (Klaassen, 1986).

Además, la velocidad con que una sustancia química es excretada depende, a su vez, de la distribución y biotransformación. Si la sustancia química es distribuida y almacenada en el tejido adiposo, es probable que la eliminación sea lenta porque no está disponible para su eliminación. Además, muchas sustancias químicas, como la mayoría de los disolventes, son muy liposolubles y no pueden ser excretadas hasta que se haya biotransformado a un producto hidrosoluble.

En conclusión, los procesos toxicocinéticos de absorción, distribución, biotransformación y excreción, están estrechamente relacionados y son factores determinantes de la toxicidad de los compuestos químicos.

También, el control biológico de la exposición industrial a una sustancia tóxica deriva del conocimiento de su toxicocinética. Cuando el parámetro biológico consiste en determinar la misma sustancia o sus metabolitos en un medio biológico, es esencial precisar, en primer lugar, de qué manera se ha absorbido la sustancia a través de las posibles vías, cómo se ha distribuido por los diferentes compartimentos del organismo y cómo es biológicamente transformada y finalmente eliminada. También es importante determinar si se acumula en el organismo.

Si se sigue la evolución de la concentración de un disolvente en compartimentos distintos del organismo durante un período de exposición de 8 horas y después de ésta, se observa que cuando la exposición es constante, la concentración de la sustancia aumenta progresivamente, pero la velocidad de acumulación varía según la afinidad del disolvente por los diferentes tejidos y su grado de perfusión. La concentración de muchos disolventes en el aire alveolar y en la sangre aumenta rápidamente y alcanza el equilibrio en horas. Sin embargo, en algunos tejidos pocos vascularizados, como el tejido adiposo, la velocidad de acumulación es menor.

Cuando termina la exposición, la eliminación de la sustancia se realizará con una vida media variable de un compartimiento a otro, por lo que la eliminación de un disolvente liposoluble suele ser lenta. Si antes de reemprender el trabajo, la concentración del disolvente no ha llegado al nivel basal, hay que temer su acumulación progresiva en el organismo durante la semana laboral.

Todos estos aspectos toxicológicos deben ser cuidadosamente analizados con la finalidad de determinar el momento más oportuno para tomar la muestra biológica (Lauwerys, 1994).

1.2.1. ABSORCIÓN

La absorción es el proceso por el cual los tóxicos pasan del medio exterior al sistema sanguíneo. Los principales lugares de absorción son el tracto gastrointestinal, pulmón y piel (Klaassen, 1986).

- **Vía pulmonar o respiratoria.** Todas las sustancias que se encuentran en forma de gases, vapores, humos, polvos, fibras pueden ser inhaladas. En el caso de los disolventes, la vía respiratoria es la más importante, siendo la inhalación la principal vía de exposición laboral. La absorción inhalatoria depende de las propiedades físico-químicas de los agentes y de la configuración anátomo-fisiológica de la vía respiratoria. Por lo general los disolventes orgánicos son líquidos volátiles cuyos vapores son solubles en lípidos y de ahí se absorben bien por la membrana alvéolo capilar, pasando fácilmente a través de los pulmones hasta entrar en la sangre por un mecanismo de difusión pasiva desde una zona en donde el xenobiótico se encuentra a elevadas concentraciones, hasta la zona interna donde esta concentración es mucho menor o nula. La cantidad de tóxico inhalada va a depender fundamentalmente de la concentración ambiental, del tiempo de exposición y del esfuerzo físico realizado.

Debido a que la actividad física incrementa la velocidad pulmonar y el flujo de sangre, también incrementa, de la misma forma, la cantidad del disolvente que llega a los alvéolos, así como la cantidad absorbida. La retención pulmonar, o captación (porcentaje de la dosis inhalada que se retiene y absorbe) de la mayor parte de los VOCs varía del 40 al 80 por ciento en reposo. Con los niveles de ejercicio físico que se encuentran con frecuencia en los sitios de trabajo, se eleva la captación pulmonar de muchos de los disolventes en 2 a 3 veces comparada con la del reposo.

- **Vía percutánea o dérmica.** En la absorción por la piel, un tóxico atraviesa las células de la epidermis. La principal barrera que debe franquear es el estrato córneo, que está formado por una capa de

células muertas. Toda la epidermis es avascular y las sustancias deben de difundir, atravesando varias capas hasta llegar a la dermis vascularizada. El único mecanismo que lo hace posible es la difusión. Las sustancias polares pueden penetrar disolviéndose en las prolongaciones de proteínas. Las sustancias apolares lo hacen por los lípidos que existen entre los filamentos proteicos. Afortunadamente, la piel no es muy permeable por la barrera lipídica. Sin embargo, algunos productos químicos pueden ser absorbidos por la piel en cantidad suficiente para producir efectos sistémicos.

La facilidad con que una sustancia se absorbe a través de la piel depende fundamentalmente de sus propiedades químicas (capacidad de disolverse en agua o en grasas) y del estado más o menos deteriorado de la propia piel. Depende también de los hábitos higiénicos de los trabajadores, pensemos por ejemplo en un trapo lleno de aceite o disolvente en los talleres que puede llevar un trabajador metido en el pantalón que poco a poco se va impregnando y atravesando la piel. La solubilidad en lípidos de los disolventes orgánicos da lugar a que, tras el contacto directo, sean absorbidos en mayor o menor medida por la piel.

No obstante, la absorción percutánea también depende de la solubilidad en agua y de la volatilidad. Las sustancias muy volátiles se absorben peor, porque tienden a evaporarse de la piel, a menos que se impida la evaporación por oclusión con guantes o ropa. Hay que evitar dañar la piel con disolventes orgánicos que eliminan la capa sebácea natural que sirve de barrera contra sustancias corrosivas e irritantes. Para varios de los disolventes, la absorción dérmica contribuye a la exposición total lo suficiente como para que aparezca señalada en la lista de “Límites de exposición profesional para agentes químicos en España” del INSHT con la notación «vía dérmica». Esta llamada advierte, por una parte, de que la medición de la concentración ambiental puede no ser suficiente para cuantificar la exposición global y, por otra, de la necesidad de adoptar medidas para prevenir la absorción a través de la piel.

- **Vía digestiva**: ligada fundamentalmente a hábitos o prácticas incorrectas, tales como beber, comer y fumar en el puesto de trabajo, siendo los disolventes ingeridos a través de la boca por contacto con las manos, bebidas, alimentos y cigarrillos contaminados.

1.2.2. DISTRIBUCIÓN

Tras su absorción por cualquiera de las vías señaladas, el tóxico se distribuye en el organismo según sus afinidades y provoca lesiones en los órganos diana.

La distribución es el movimiento de las sustancias absorbidas dentro del organismo, desde el lugar de absorción hasta los tejidos. Una vez en el plasma, los tóxicos se distribuyen por todo el organismo. Normalmente, la distribución ocurre rápidamente y el tipo de distribución a los tejidos de cada órgano está determinado por la corriente sanguínea.

Los tóxicos atraviesan las paredes capilares y penetran a las células de los tejidos. Esta distribución depende de la afinidad y de la capacidad de los productos químicos para atravesar las membranas celulares de los diferentes tejidos. Algunas sustancias tóxicas no atraviesan realmente las membranas celulares y tienen, por tanto, una distribución restringida. Otras, sin embargo, sí las atraviesan y se distribuyen por todo el organismo, acumulándose en varias partes del cuerpo como resultado del transporte activo o la alta solubilidad en grasas. Después se encontrarán membranas biológicas que sólo son asequibles a las sustancias lipofílicas y, aún dentro de ellas, las hay peculiares como la barrera hematoencefálica que tiene un poro muy fino, un endotelio muy grueso y con pocas proteínas, de tal modo que sólo es franqueable a las sustancias liposolubles.

En vista de que los disolventes orgánicos son lipofílicos, tienden a distribuirse a los tejidos ricos en grasas como el tejido adiposo, el sistema nervioso y el hígado. Debido a que la distribución se realiza por la sangre y a que las barreras de la membrana entre la sangre y los tejidos suelen ser ricas en

lípidos, los disolventes también se distribuyen hacia órganos con gran irrigación, como el músculo cardiaco y el esquelético. Las personas con mayor cantidad de tejido adiposo acumulan mayores cantidades de disolvente con el tiempo y, en consecuencia, excretan mayores cantidades a menor velocidad una vez que cesa la exposición.

El sistema nervioso central así como la placenta, se comportan como una membrana lipóide fácilmente atravesada por los compuestos liposolubles y con mucha dificultad para los compuestos hidrosolubles. Casi todos los disolventes atraviesan la placenta y también llegan a la leche materna.

1.2.3. METABOLISMO O METABOLIZACIÓN

Son las transformaciones del compuesto dentro del organismo antes de ser eliminado. Muchos de los disolventes han de ser transformados (metabolizados) por una o varias reacciones, a productos más solubles para facilitar así su eliminación por el organismo.

El manto lipídico que rodea al ser vivo es impermeable; mantiene el medio interno, por lo que las sustancias liposolubles jamás podrán salir del organismo. En la biodegradación suceden alteraciones bioquímicas en la molécula, transformando la molécula liposoluble a hidrosoluble.

El hígado contribuye de forma mayoritaria a la función de facilitar la eliminación de los xenobióticos lipófilos, mediante un conjunto de reacciones, globalmente denominadas de biotransformación, en las que se modifica de manera más o menos compleja la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y así facilitar su eliminación. Pero en ocasiones, la metabolización puede generar la formación de un derivado o metabolito más tóxico que el original, por ejemplo el n-hexano da lugar a la 2,5-hexanodiona, que es un neurotóxico.

La biotransformación de químicos, implicando rutas de activación y de detoxificación, juega un papel primordial en la carcinogénesis química (Laffon y cols., 2003), tal y como se muestra en el siguiente esquema.

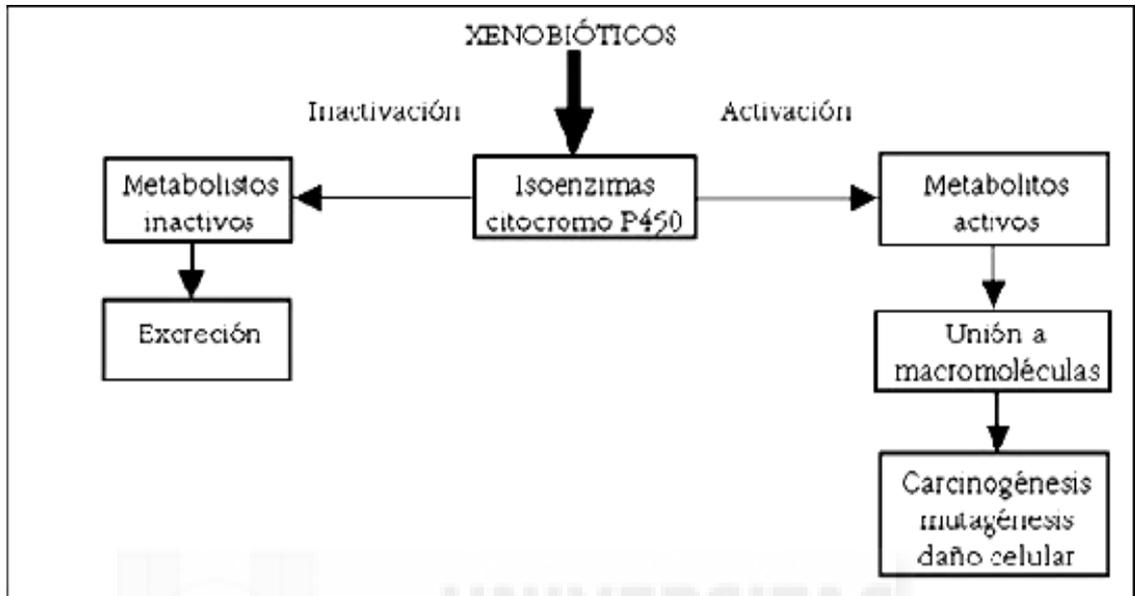


Figura 2. Reacciones de biotransformación de xenobióticos, mediadas por citocromo P450. Fuente: Orellana y Guajardo, 2004

El proceso de biotransformación se subdivide en etapas o fases.

- Primera etapa o FASE I:

Bajo esta denominación, se engloban procesos químicos de distinta naturaleza (principalmente oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis, así como, de-aliquilaciones, deshalogenaciones), cuyo resultado es la modificación química de las moléculas con la aparición de nuevos grupos funcionales. El metabolito resultante es más polar, más reactivo, y sensiblemente menos lipófilo. Estos procesos son mayoritariamente catalizados por enzimas presentes en la fracción microsomal del homogenado celular.

Las reacciones de fase I son catalizadas por un grupo de enzimas que se encuentran tanto en el citosol como en el retículo endoplásmico de las células. En la fracción microsomal destaca sobre todo la presencia de una actividad monooxigenasa singular. En la fracción citosólica celular se encuentran otras

actividades enzimáticas, no oxidativas, incluidas también en las reacciones de fase I tales como las esterasas, reductasas, deshidrogenasas e hidrolasas, etc. Las monooxigenasas son enzimas que hacen uso del oxígeno molecular, del que utilizan uno de los átomos para oxigenar al xenobiótico (oxidación + incorporación de oxígeno a una molécula orgánica), al tiempo que el otro átomo termina reducido a H₂O. Existen dos grandes familias de oxigenasas en el hígado: las dependientes de citocromo P450 (denominadas CYP) y las flavín monooxigenasas (denominadas FMO). A diferencia de las segundas, la acción de los CYP requiere de la coparticipación de una enzima auxiliar (CYP reductasa), a través de la cual fluyen los electrones necesarios para la reducción de uno de los átomos de oxígeno hacia la formación de H₂O (Cascales, 2004).

El genoma humano contiene al menos 50 genes P450 distintos subdivididos en 10 familias distintas y funcionan como una oxidasa terminal en una cadena de transporte de electrones (Autrup y cols., 2002). El sistema de citocromo P450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja, tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar. Existen varios tipos de moléculas de citocromo P450 incluso en individuos de una misma especie (Donato, 2004). Un estudio publicado en 1997 sobre el metabolismo de 315 fármacos utilizados en clínica humana, reveló que en el 56% de ellos, su biotransformación es principalmente catalizada por isoenzimas del citocromo P450 (Rendic y di Carlo, 1997).

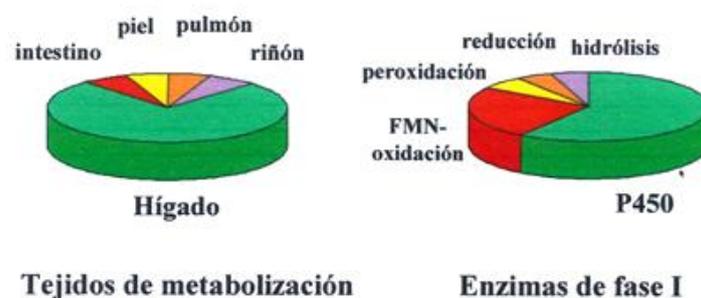


Figura 3. Metabolización de xenobióticos. Principales tejidos donde se llevan a cabo los procesos de metabolización y enzimas involucradas en la fase I del metabolismo. Fuente: Donato, 2004

- Segunda etapa o FASE II

Las reacciones que ocurren en esta fase, suelen actuar sobre el grupo reactivo introducido en la fase I. En la fase II, los metabolitos generados en la fase I se unen covalentemente a moléculas endógenas de la célula y que tienen carácter polar, tales como ácido glucurónico, glutatión, sulfato y aminoácidos generando conjugados. Este proceso conlleva un considerable aumento de la hidrosolubilidad y, por lo general, también una disminución de su actividad toxicológica. Estas reacciones están catalizadas por enzimas transferasas, presentes en la fracción citosólica celular. Las principales reacciones son las siguientes:

- **Glucuronidación:** La conjugación se lleva a cabo con el ácido glucurónico por acción de la UDP-glucuroniltransferasa. Esta es la principal ruta de conjugación.
- **Acetilación:** Cuando se incorpora un grupo acetilo sobre un grupo ácido carboxílico o amino por acción de una acetiltransferasa y la coenzima A.
- **Conjugación con glutatión (GHS):** Cuando la enzima participante es la glutatión-S-transferasa (GST) que adiciona una molécula de GSH sobre metabolitos de naturaleza electrofílica.
- **Conjugación con sulfato:** Cuando la enzima sulfotransferasa adiciona un grupo sulfato a compuestos fenólicos, esteroides hidroxilados y aminas aromáticas, principalmente. El producto de la reacción es un sulfato orgánico ionizado, muy soluble en agua.

1.2.3.1. Principales enzimas de Metabolización

1.2.3.1.1. Enzimas de fase I

Citocromo P450

En principio se pensó que los citocromos P450 eran proteínas exclusivamente hepáticas, pero posteriormente se descartó al comprobarse la presencia de estas enzimas en prácticamente todo el organismo, e incluso algunos son exclusivamente extrahepáticos (Ding y cols., 2003). No obstante, el hígado es el órgano con mayor expresión de estos enzimas; en él se encuentran tanto los citocromos P450 implicados en reacciones fisiológicas como los encargados del metabolismo de xenobióticos. (Donato 2004).

La expresión hepática del citocromo P450 varía extraordinariamente entre diferentes individuos como consecuencia de factores genéticos fisiopatológicos y ambientales (Clarke y cols., 2003). Algunos P450 presentan expresión polimórfica, lo que conduce a variantes del enzima que pueden tener alterada su actividad catalítica. Los diferentes fenotipos pueden traducirse en variaciones del metabolismo en determinados individuos. (Donato, 2004).

Se ha apuntado la existencia de diferencias en la actividad del citocromo P450 en función de la edad del individuo aunque los resultados no son totalmente concluyentes (Blanco y cols., 2000; Gow y cols., 2001). El sexo se considera otro factor modulador de la actividad de estos enzimas, ya que se ha demostrado que algunas formas del citocromo P450 solo se expresan en ratas macho y otras son específicas de ratas hembra (Mugford, 1998). La influencia de la dieta y el estado nutricional también han sido estudiados. Así mismo el alcohol y ciertos componentes del humo del tabaco pueden producir inducción o inhibición del citocromo P450 y finalmente a los factores antes mencionados, habría que sumar los posibles efectos inductores o inhibidores producidos por la ingestión, inhalación o contacto con los xenobióticos en general incluyendo en este grupo a los contaminantes ambientales, productos tóxicos industriales o incluso a los fármacos (Donato, 2004).

Factores que regulan el P450



Figura 4. Factores endógenos y exógenos que regulan la actividad de citocromo P450. Fuente: Donato, 2004.

Hay 13 familias CYP. Las familias se basan en homología de secuencias proteicas. Todos los miembros de la familia tienen al menos el 40% de los aminoácidos iguales. Hay 22 subfamilias (A, B, C...) Los miembros de una misma subfamilia tienen > 55% de aminoácidos iguales. Hay 60 isoformas específicas. Las más importantes son: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4

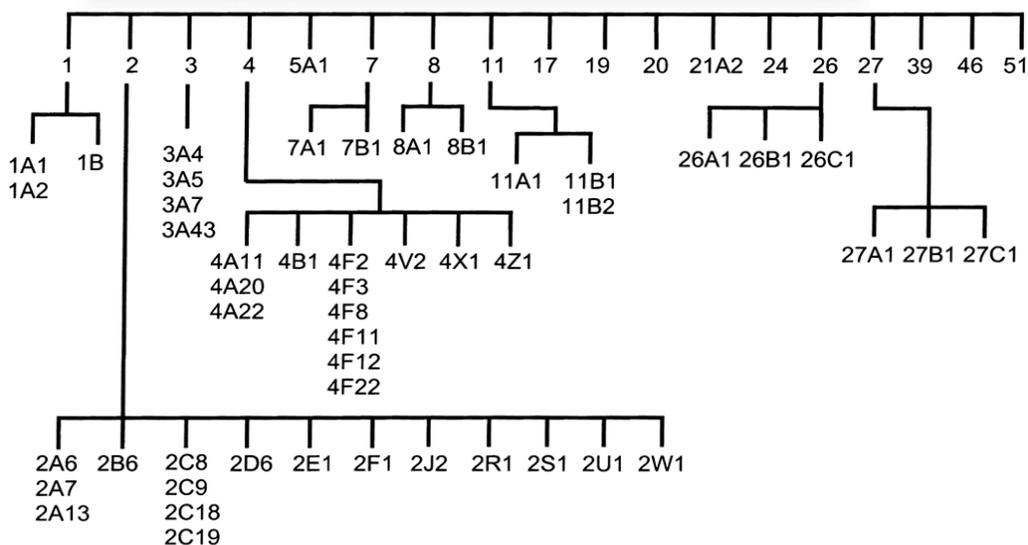


Figura 5. Los enzimas P450 identificados en la especie humana. Fuente: Donato, 2004.

- **CYP2E1**

El CYP2E1 es una enzima clave en las reacciones de toxicidad, ya que está implicada en la activación de numerosos procarcinógenos y protoxinas, y metaboliza además numerosos xenobióticos como etanol, benceno, tolueno, nitrosaminas, así como ciertos fármacos como acetaminofeno y clorzoxazona (Lieber, 1997). Ayuda a procesar compuestos y descompone xenobióticos, y esta actividad puede dar como resultado subproductos nocivos y otras toxinas, que pueden causar lesión hepática (Lieber, 1999).

Debido al particular espectro de sustratos sobre los que actúa, la isoforma del citocromo P450 denominada CYP2E1 es de gran interés para la medicina ocupacional y medioambiental. CYP2E1 oxida no solo etanol a acetaldehído, sino también importantes químicos industriales como alcanos, alquenos, hidrocarburos aromáticos y halogenados y fármacos (Bolt y cols., 2003) y es por ello que se considera a esta enzima en una posición clave para la formación de metabolitos tóxicos de los productos químicos industriales (Thier y cols., 2003). Se sabe que un alelo mutante C2 del gen CYP2E1 es responsable de una mayor actividad de la enzima (Nakamura, 2003).

Nakamura y cols., (2003) comprobaron que en una población oriental alcohólica con genotipo aldehído deshidrogenasa 2 heterocigoto, las personas que eran portadoras de mutaciones CYP2E1 soportaban mejor el alcohol que aquellos individuos homocigotos para el CYP2E1 wild type, demostrándose así que el genotipo de CYP2E1 puede determinar un patrón del individuo en relación con su hábito alcohólico.

Los niveles de CYP2E1 varían interindividualmente debido, sobre todo, a su inducibilidad por xenobióticos, como el etanol y compuestos orgánicos volátiles. Además, como se ha mencionado anteriormente, existen varios polimorfismos genéticos identificados que también pueden contribuir a esta variabilidad de la actividad enzimática; sin embargo, la relación genotipo-fenotipo no está aún consolidada.

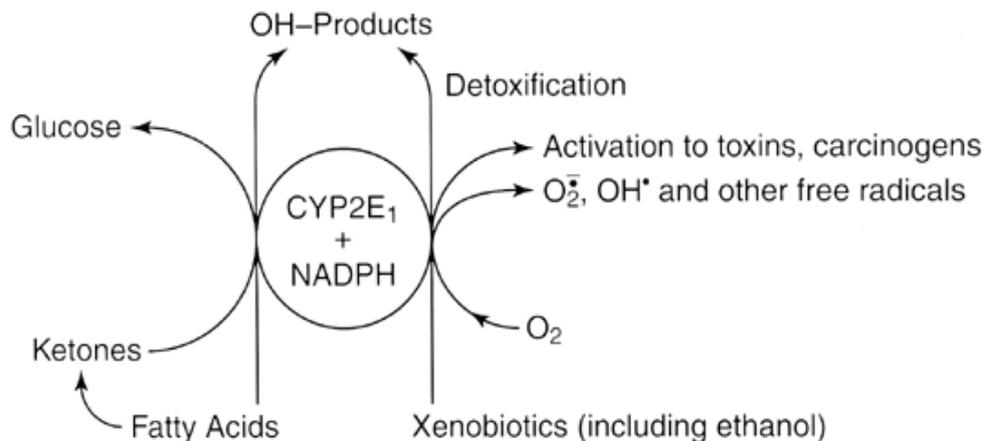


Figura 6. Funciones de CYP2E1 conjuntamente con NADPH. FUENTE: Lieber, 1999

Los niveles más altos del enzima CYP2E1 se encuentran en el hígado aunque también está expresada en tejidos extrahepáticos (pulmón, riñón, mucosa nasal, cerebro y médula ósea) (Botto y cols., 1994; Subramanian y Ahmed, 1995; Vieira y cols., 1998; Mostafa y cols., 1999), incluyendo las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra cuya degeneración por xenobióticos induce enfermedad de Parkinson (Jenner, 1998). Además este isoenzima se expresa en linfocitos circulantes permitiendo la cuantificación de su mRNA en sangre periférica (Haufroid y cols., 2001), ya que se encuentra influenciada por los mismos factores que afectan a la concentración del enzima hepático (Raucy y cols., 1995 y 1997).

El enzima CYP2E1 presenta polimorfismos en humanos y los distintos genotipos podrían, al menos en parte, estar relacionados con los diferentes niveles individuales de la expresión de la actividad enzimática (Bogaards y cols., 1993; Raucy y cols., 1993; Garte y cols., 2001; Thier y Bolt, 2001). Los polimorfismos más frecuentemente estudiados son los RFLPs PstI/RsaI localizado en la región 5' del gen (Hayashi y cols., 1991) y el polimorfismo DraI localizado en el intrón 6 (Uematsu y cols., 1991b). Garte y cols. (2001) han recogido las frecuencias y distribución de alelos de más de 15.000 controles (sin cáncer) y de sus combinaciones

resultando que la variante Drai aparece en el 10% de la población que se correlacionó con una menor relación metabólica de cloroxazona (CZX) sustrato del enzima (Haufrond y cols., 2002b). Las diferencias genotípicas PstI/RsaI son altas cuando se comparan las etnias europeas y asiáticas. Las razas caucásicas se muestran heterocigotas en un 5%, pero las asiáticas en un 37%.

La medida más precisa de la actividad enzimática de CYP2E1 (su estado fenotípico), se ha basado hasta la fecha en su análisis en tejido hepático, que requiere de la realización de una biopsia hepática, método invasivo que no puede ser utilizado para el análisis poblacional. Otros métodos se basan en la administración oral de CZX (cloroxazacina) (prohibido en Europa) y el análisis de sus metabolitos excretados (Lucas y cols., 1995 y 1999). Ambos procedimientos son largos y tediosos por lo que la medida de su mRNA mediante RT-PCR a tiempo real, metodología recientemente descrita (Haufrond y cols., 2001), podría permitir el fenotipado rápido de grandes poblaciones para estudios epidemiológicos, programas de biomonitorización y seguimiento de pacientes alcohólicos.

1.2.3.1.2. Enzimas de fase II

Las enzimas de la fase II del metabolismo aprovechan grupos electrofílicos presentes originalmente en la molécula sustrato, o bien introducidos por los enzimas de fase I, para llevar a cabo reacciones de conjugación, usando para ello moléculas de bajo peso molecular, como glutatión, UDP-ácido glucurónico o acetil coenzima A. Estas reacciones desembocan generalmente en una inactivación farmacológica o detoxificación de la sustancia conjugada.

- **Glutatión S-transferasas (GSTs)**

Concretamente un grupo de enzimas destacables por su importancia en este tipo de procesos son las pertenecientes a la familia de la glutatión S-transferasas (GSTs). Las glutatión S-transferasas (GSTs)

componen una superfamilia de enzimas que catalizan la conjugación de mutágenos, carcinógenos, contaminantes ambientales, fármacos y algunos compuestos endógenos con glutatión para facilitar su eliminación. Estas enzimas están consideradas clásicamente como parte de la defensa celular contra numerosas sustancias químicas dañinas, producidas endógenamente o procedentes del ambiente, desempeñando un papel esencial de protección contra procesos de estrés oxidativo y productos electrofílicos, ya que se encargan de la conjugación de dichos compuestos con glutatión reducido (Autrup y cols., 1999).

Dentro de la familia de las enzimas citosólicas GSTs, que incluyen al menos ocho subfamilias (A, K, M, P, S, T, Z y O), se han encontrado tres principales genes polimórficos (GSTP1, GSTM1 y GSTT1) que han sido estudiados ampliamente en los últimos años y que dan lugar a alteraciones en la actividad catalítica de las enzimas para las que codifican. La familia de genes GSTM, está formada por cinco genes que se sitúan en tándem, 5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3', en una región de 40 Kb en el cromosoma 1 (1p13.3) (Strange y cols., 2001).

Se han identificado polimorfismos en GSTM1 y se están estudiando profusamente las consecuencias clínicas del genotipo nulo (alelo delecionado), ya que los homocigotos nulos no expresan la proteína correspondiente, siendo por consiguiente, deficitarios respecto a su actividad enzimática. Dado que la frecuencia de este polimorfismo nulo GSTM1*0 alcanza al 50 % de la población caucásica, e incluso puede llegar hasta más del 60% en otras poblaciones, los estudios sobre las consecuencias biológicas de este polimorfismo han despertado un gran interés en la última década, de forma especial con relación al riesgo frente a neoplasias de ciertos órganos, como pulmón, vejiga, mama y colon (Autrup, 2000).

GSTT1 también presenta una variación asociada a presencia o ausencia de actividad enzimática, cuya presencia es menor en personas de raza blanca (20%). La enzima GSTT1, ha suscitado gran interés desde que Pemble y cols. (1994) identificaron el alelo nulo, que además ha sido considerado como factor influyente en el riesgo de cáncer.

GSTP1 se caracteriza por codificar la isoforma enzimática más abundante en los pulmones y por tanto de particular importancia en la detoxificación de carcinógenos inhalados. Dos son los codones afectados por polimorfismos, y los aminoácidos que codifican se encuentran en el sitio activo de unión a electrófilos de la enzima. Las variantes que implican cambios aminoacídicos son: Ile105Val, provocado por una transición en el nucleótido 313 del exón 5, y Ala114Val, resultante de una transición en la posición 314 del exón 6. Los alelos resultantes se clasifican como *A (homocigoto salvaje para ambos loci), *B (portador del cambio aminoacídico Ile105Val) y *C (que presenta ambas mutaciones). Las proteínas codificadas por ellos poseen distinta estabilidad térmica y afinidad por el sustrato. El polimorfismo relativamente frecuente GSTPVal105 conlleva una reducción de la actividad glutatión transferasa.

Existen muchos estudios que han intentado asociar la presencia de estos polimorfismos con numerosas enfermedades: ciertos tipos de cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, leucemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otros síndromes menores.

Se han identificado distintos polimorfismos de enzimas de metabolismo de fase I y fase II que exhiben frecuencias alélicas dependientes de la etnicidad. Además de los mencionados, el gen CYP1A1 codifica para la enzima de fase I aril hidrocarbano hidroxilasa que participa en el proceso de bioactivación de xenobióticos procarcinógenos como el benzo(a)pireno y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) producidos en la combustión incompleta de materia orgánica y que están presentes en el humo del tabaco.

Posteriormente las enzimas de fase II como las GSTs conjugan los metabolitos producidos en la fase I para su eliminación. Los polimorfismos genéticos de estas enzimas metabólicas son la base de un gran número de estudios enfocados a descifrar su rol en la carcinogenesis química por incrementar la susceptibilidad de los individuos a formar aductos DNA-PAHs que producen mutaciones y pueden conducir a la formación de tumores.

En la Tabla siguiente se muestra un resumen de los genes más importantes mencionados, sus variantes polimórficas, y la actividad enzimática resultante de ellas.

Tabla 3. Características genotípicas y actividad enzimática asociada.

Gen	Variante	Cambio aminoacídico	Influencia en la enzima
GSTP1	*B	Ile 105 Val	Alteración sustrato dependiente
	*C	Ile 105 Val + Ala 114 Val	Alteración sustrato dependiente
GSTM1	Nulo	Ausencia de proteína	Falta de actividad
GSTT1	Nulo	Ausencia de proteína	Falta de actividad

Fuente: Laffon y cols., 2004

1.2.4. ELIMINACIÓN

El organismo elimina los xenobióticos a través del riñón principalmente. Esto se realiza sin problemas cuando se trata de sustancias hidrosolubles o muy disociadas. Sin embargo, las sustancias liposolubles cuando son eliminadas por el riñón encuentran en el túbulo una membrana biológica y se reabsorben, porque para estas sustancias existiría una fijación tisular reversible, toda vez

que siempre encontrará una barrera biológica en la que se disolverá, volviendo a penetrar a la célula.

La eliminación de los disolventes se produce, bien a partir de la exhalación de los compuestos sin cambios, o a través de la eliminación de los metabolitos por orina, o la combinación de ambos mecanismos. Varía la vida media biológica de los compuestos originales de unos cuantos minutos a varios días, de tal modo que algunos de los disolventes se acumulan en cierto grado durante una semana laboral, en tanto que otros no lo hacen. Sin embargo, la acumulación biológica más allá de unos cuantos días no es un factor determinante importante de los efectos adversos sobre la salud para la mayor parte de los disolventes.

El tiempo durante el cual, una sustancia o un metabolito se encuentran en el organismo, y por tanto en cada tejido y órgano, hasta su desaparición de los medios biológicos una vez ha cesado la exposición, es característico de esa sustancia o del metabolito. No obstante, más que el tiempo total de permanencia en el organismo o en un tejido concreto, interesa la semivida, o vida media, es decir, el tiempo que tarda en reducirse a la mitad la concentración (respecto del momento en que es máxima o del final de la exposición) en el compartimento en cuestión (o el tejido/órgano concreto) objeto de interés, y si se trata de todo el cuerpo, el tiempo necesario para reducirse a la mitad la cantidad total existente en el organismo, y se pueden determinar experimentalmente, siempre con un margen de variabilidad fisiológica y experimental. Lo más habitual es que la eliminación de un xenobiótico no tenga lugar de manera uniforme, sino que transcurra por fases, cada una con su propia cinética, lo que implica, de hecho, que cada una de ellas tenga su propia semivida. Hay xenobióticos cuya eliminación tiene lugar en tres fases, con una fase rápida de unas horas, una fase lenta de unas semanas o meses, y con una tercera fase muy lenta, que puede durar años. Esa, juntamente con todo lo expuesto, es una de las razones por las que, en el caso de realizar control biológico de la exposición en el ámbito laboral, la toma de muestras debe hacerse en el momento adecuado, y hay diferentes momentos de muestreo, incluso para un mismo contaminante. La relación entre

la semivida de un compuesto en el organismo, su significación en cuanto a la exposición del trabajador y la importancia frente a la toma de muestras pueden verse en la tabla siguiente. Aunque en el control biológico se evalúa la exposición y/o el riesgo, la vida media del indicador empleado es el factor determinante del tipo de exposición sobre la que informa su medición y del momento en que debe realizarse la toma de muestra en el medio biológico de elección y el rigor exigido en ello.

Tabla 4. Tipo de exposición según la semivida del indicador y momento de muestreo

SEMIVIDA DEL INDICADOR en el medio de muestreo	REPRESENTATIVO DE LA EXPOSICIÓN	MOMENTO DE MUESTREO
$t_{1/2} < 2$ horas	Reciente (últimas 2-3 horas)	Muy crítico
$2 < t_{1/2} < 5$ horas	Diaria (conjunto de la jornada laboral)	Crítico
$5 < t_{1/2} < 48$ horas	Semanal	Final de semana de trabajo (no crítico)
$t_{1/2} > 48$ horas	Mensual o mayor	Discrecional (imprescindible un periodo previo de equilibrio de varios meses de exposición)

Fuente: INSHT, 2001

1.3. TOXICODINAMIA. EFECTOS DE LOS AGENTES TÓXICOS EN EL ORGANISMO

La toxicodinamia estudia los efectos de los agentes tóxicos sobre el organismo, en distintas condiciones de exposición y los mecanismos a través de los cuales llegan a producirse. El tejido, célula o estructura del organismo sobre el que actúa un agente tóxico es el llamado sitio diana. El primer efecto que se

presenta en los individuos expuestos en unas determinadas condiciones recibe el nombre de efecto crítico en tales condiciones de exposición. En general, los valores límite de exposición se fijan, directa o indirectamente, de tal manera que no lleguen a producirse efectos adversos ni, aún menos, enfermedades en los trabajadores crónicamente expuestos a las sustancias en cuestión, tomando como base, entre otros elementos, el efecto crítico en trabajadores con exposiciones laborales bien establecidas y cuantificadas.

En el siguiente esquema podemos observar cual es el trayecto de un agente químico a través del organismo, desde el momento en que el individuo se pone en contacto con él y el destino que va seguir hasta alcanzar el sitio diana efector, y con los consiguientes efectos adversos que a su vez, van a provocar lesiones más o menos irreversibles.

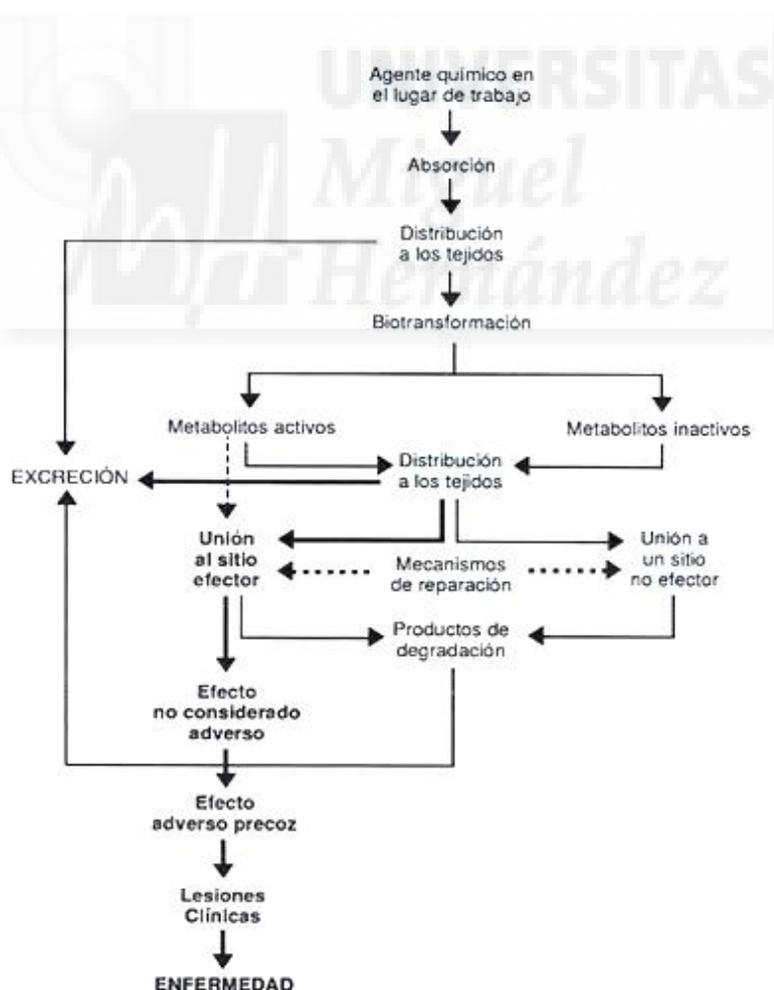


Figura 7. Destino de un agente químico en el sitio efector del organismo. Fuente: INSHT. 2001.

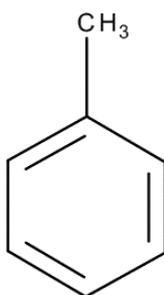
1.4. TOLUENO, XILENO Y n-HEXANO EN LA INDUSTRIA DEL CALZADO

En la fabricación del calzado, se utilizan materias primas con un gran contenido en disolventes orgánicos, que constituyen la principal fuente de riesgos tóxicos. La composición de los adhesivos en los procesos de pegado, así como la mezcla de disolventes utilizados en otros procesos, son muy variadas y esto repercute en su potencial toxicidad. Se han detectado casos de polineuropatía desmielinizante o también llamada “parálisis del calzado” de la cual es responsable el principal metabolito del n-hexano (Spencer y Schaumburg, 1976).

Entre los disolventes más utilizados en los procesos de fabricación del calzado se encuentran: n-hexano, tolueno, xilenos y cetonas.

1.4.1. TOLUENO

1.4.1.1. Generalidades, usos y propiedades



Sinónimos: Toluol, Metilbenceno, Metilbenzol, Fenil-metano.

Formula química: C₇H₈, C₆H₅-CH₃. Composición: C: 91.25 % , H: 8.75 %.

Peso molecular: 92.13 g/mol

El tolueno es un líquido incoloro con un olor parecido a los disolventes de pintura. Es miscible en la mayoría de disolventes orgánicos apolares pero casi inmisible en el agua. Existe en forma natural en el petróleo crudo y en el árbol tolú. También se produce durante la elaboración de gasolina y de otros combustibles a partir de petróleo crudo y en la obtención de coque a partir de carbón. . Es derivado del benceno y es compuesto bastante no polar, pero es más polar que el benceno por el grupo metil unido a uno de los carbonos del benceno.

El tolueno tiene una producción mundial de entre 5 a 10 millones de toneladas al año. Es un aditivo del petróleo, Y está presente en todo el mundo, en muchas ocasiones, junto con otros disolventes. Esta sustancia tiene limitaciones a la comercialización y uso según la ORDEN PRE/2743/2006, de 5 de septiembre, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre. Es altamente inflamable. Cuando arde produce gases irritantes, corrosivos y/o tóxicos.

- USOS

El tolueno se utiliza como disolvente de aceites, resinas, caucho natural (mezclado con ciclohexano) y sintético, alquitrán de hulla, asfalto, brea y acetilcelulosas (en caliente, mezclado con etanol). También se utiliza como disolvente y diluyente de pinturas revestimientos, caucho, resinas, diluyente en lacas nitrocelulósicas, en adhesivos y como diluyente de las tintas de fotograbado. El tolueno se encuentra en mezclas que se utilizan como productos de limpieza en distintas industrias y en artesanía. También se utiliza en la fabricación de detergentes y cuero artificial y es una importante materia prima para síntesis orgánica como ácido benzoico, cloruro de bencilo y diisocianato de tolueno.

El tolueno se adiciona a los combustibles como antidetonante y es el producto de partida en la síntesis del TNT (2,4,6-trinitrotolueno). También se puede utilizar en la fabricación de colorantes.

- PROPIEDADES FISICAS Y TERMODINAMICAS:

Punto de ebullición: 111°C

Punto de fusión: -95°C

Densidad : 0.87 g/ml (a 20°C), 0.8623 (a 25°C)

Densidad de vapor: 3.14

Presión de vapor (a 30°C): 37.7 mm de Hg

Indice de refracción (a 20°C): 1.4967

Punto de inflamación en copa cerrada (Flash point): 4°C

Temperatura de autoignición: 530- 600°C

Límites de explosividad: 1.27- 7 % (en volumen en el aire)

Temperatura crítica: 318.64°C.

Presión crítica: 40.55 atm

Volumen crítico: 0.317 l/mol

Calor de combustión (a 25°C y presión constante): 934.5 Kcal/mol

Calor de vaporización (a 25°C): 9.08 Kcal/mol.

Capacidad calorífica (cal/g K) : 0.2688 (gas ideal), 0.4709 (líquido a 1 atm)

Tensión superficial (mN/m): 27.92 (a 25°C)

Calor de formación (Kcal/mol) : 11.950 (gas), 2.867 (líquido).

Energía libre de formación (Kcal/K): 22.228 (gas), 27.282 (líquido)

- PROPIEDADES QUIMICAS

Solubilidad: muy poco soluble en agua (0.05 g/100 ml), miscible con éter, acetona, etanol, cloroformo, ácido acético glacial, disulfuro de carbono y aceites.

Productos de descomposición: monóxido y dióxido de carbono.

En general, es incompatible con agentes oxidantes. Se ha informado de reacciones explosivas durante la nitración de este producto químico con ácido nítrico y sulfúrico, cuando las condiciones no son controladas cuidadosamente. Reacciona de la misma manera con una gran cantidad de oxidantes como trifluoruro de bromo (a -80°C), hexafluoruro de uranio, tetróxido de dinitrógeno,

perclorato de plata, 1,3-dicloro-5,5-dimetil-2,4-imidazolin-2,4-diona y tetranitrometano.

- NIVELES DE TOXICIDAD:

RQ: 1000 IDLH: 2000ppm

LD₅₀ (en ratones): 5300 ppm.

LD₅₀ (en piel de conejos): 14000 mg/Kg.

LD₅₀ (oral en ratas): 7.53 ml/Kg, 5000 mg/ Kg.

LDLo (oral en humanos): 50 mg/Kg.

LC₅₀ (por inhalación en ratones): 5320 ppm/8 h

Niveles de irritación a ojos: 300 ppm (humanos); 0.87 mg, leve y 2 mg/24 h, severa (conejos).

Niveles de irritación a piel de conejos: 435 mg, leve; 500 mg, moderada

Los niveles de exposición profesional publicados se sitúan generalmente por debajo de 200 ppm (750 mg/m³). La exposición laboral o la exposición intencionada a concentraciones superiores o iguales a 200 ppm de este disolvente están asociadas con dolores de cabeza, depresión, descoordinación, pérdida transitoria de memoria y disminución del tiempo de respuesta. Como tóxico agudo el tolueno produce narcosis del SNC. La inhalación de 100 a 200 ppm se asocia con dolor de cabeza y una ligera irritación transitoria del tracto respiratorio superior, 400 ppm con ligera irritación de ojos y lagrimeo, y 600 ppm, con lasitud y ligeras náuseas. La inhalación de 800 ppm causa irritación inmediata de ojos y tracto respiratorio, somnolencia, mareos y ataxia (ACGIH, 2016).

1.4.1.2. Toxicocinética

- ABSORCIÓN:

Los ensayos experimentales en animales y seres humanos indican que los vapores de tolueno en aire se absorben bien por el tracto respiratorio tras su

inhalación. Se estima que la absorción pulmonar equivale del 40% al 60% del total de la cantidad inhalada. Un estudio de Neubert y cols., (2001) encontraron una buena correlación entre las concentraciones medidas de tolueno en el aire y los niveles de tolueno en la sangre de trabajadores de impresoras de huecograbado al final de jornada de 6 horas, aunque la absorción por sí misma no se cuantificó.

Debido a que la absorción del tolueno ocurre a través de la matriz lipídica de la membrana, la absorción de los vapores, también puede ocurrir en la boca, y estómago. La cantidad de tolueno absorbida por cada órgano del tracto gastrointestinal depende del tiempo de contacto, del área de absorción y la partición entre la membrana lipídica y otros lípidos del tracto gastrointestinal (Pérez y Miranda, 2014). Los estudios que cuantifican la absorción oral de tolueno son limitados, pero han demostrado una absorción de casi 100% después de una sola exposición oral. En voluntarios expuestos a una perfusión de 2 mg de tolueno/minuto durante 3 horas (~ 5 mg / kg) a través de una sonda gástrica, se encontró que la absorción de tolueno fue completa, medida mediante la monitorización del tolueno en aire exhalado y mediante la determinación de metabolitos de tolueno en orina, (Baelum y cols., 1993).

El tolueno líquido también se absorbe bien por el tracto gastrointestinal. La exposición a Tolueno por ingestión no es común, salvo en casos accidentales fortuitos El tolueno se puede detectar por el sentido del gusto a partir de concentraciones entre 0,04 y 1 ppm cuando se ingiere, se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal y comparte el mismo camino que aquel que entra por la inhalación o por la piel, eliminándose por la respiración y por la orina. De forma directa en el estómago, después de una ingestión aguda de tolueno, se presenta irritación estomacal, náusea, vómito y diarrea. Si el tolueno se absorbe y distribuye por el organismo se produce depresión severa del sistema nervioso central que puede generar la muerte por asfixia o fallo cardíaco en el individuo expuesto. Los estudios de los efectos de la exposición oral al tolueno son limitados. Sólo se encontraron cuatro estudios sobre la salud en humanos después de la exposición oral al tolueno y sólo hay un

número mínimo de estudios con animales (Agency for toxic substances and disease registry, 2015).

También es posible la absorción cutánea por contacto directo con el líquido (OMS serie de informes técnicos,1992). Varios estudios han demostrado que puede ocurrir dicha absorción percutánea, aunque no cuantifican la tasa de absorción. Sato y Nakajima (1978) observaron que la inmersión de 30 minutos de las manos de los voluntarios en tolueno puro, dio como resultado un nivel inferior al 25% del tolueno sanguíneo alcanzado por una exposición de inhalación de 2 horas a 100 ppm (377 mg/ m^3)

- DISTRIBUCIÓN:

Se distribuye rápidamente en el organismo. Se acumula rápidamente en el cerebro y posteriormente se deposita en otros tejidos en función de su contenido en lípidos, alcanzando la concentración más alta en el tejido adiposo, seguido por la médula ósea, riñones, hígado, y sangre (Mercado, 2004; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015). Al incrementarse la circulación sanguínea por ejercicio físico se producen condiciones favorables para una mayor absorción en el tejido musculo esquelético, y se observa una disminución de tolueno en hígado, riñones y tracto gastrointestinal (Pérez y Miranda, 2014).

El tolueno puede atravesar la placenta y alcanzar al feto e incluso puede llegar a la leche materna (Agency for toxic substances and disease registry, 2015)

- METABOLISMO:

Entre el 60 y 80% es metabolizado, oxidándose el grupo metilo principalmente para formar alcohol bencílico y marginalmente se metaboliza a o- y p-cresol con formación ocasional de m-cresol. El alcohol bencílico es metabolizado posteriormente a ácido benzoico vía benzaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. El ácido benzoico se conjuga con la glicina para formar ácido hipúrico que es el principal metabolito final de la

cadena metabólica, que se muestra la siguiente figura. Algunas moléculas de ácido benzoico se conjugan con ácido glucurónico o carnitina. Esta reacción se llevará a cabo solamente después de exposición a grandes concentraciones de tolueno. (Nakajima y cols., 1997)

Esta metabolización es llevada a cabo por las isoenzimas del citocromo P450. En estudios realizados in vitro, el CYP2E1 es la isoenzima más activa en la formación del ácido benzílico seguida de CYP2B6, CYP2C8, CYP1A2 Y CYP1A1 (Nakajima, 1997), para bajas concentraciones de tolueno. Waxman y cols., investigaron la contribución de estas 5 isoenzimas del citocromo P450 en la formación de alcohol benzílico procedente del metabolismo del tolueno. La más activa fue CYP2B1 seguida de CYP2C11y CYP2C6, en casos de elevadas concentraciones de tolueno (Nakajima, 1997)

Aunque se metaboliza bien y casi todo el tolueno absorbido sufre una rápida biotransformación, una porción del tolueno se exhala inalterada.

Menos del 1% del tolueno absorbido se metaboliza transformándose en o-cresol, y la isoenzima CYP2A1 es la que está más involucrada en esta hidroxilación seguida de CYP2E1 Y CYP2B6. (Agency for toxic substances and disease Registry, 2015)

El hígado es el principal órgano donde ocurre el metabolismo del tolueno, aunque existen evidencias de que se realiza metabolismo en otros tejidos semejante al hepático (Fukami y cols., 2008; Wheeler y cols., 1992). La vida media biológica del tolueno en la sangre y aire alveolar es de unas 20 horas. (Mercado,2004; Klaassen 2001; WHO, 2000).

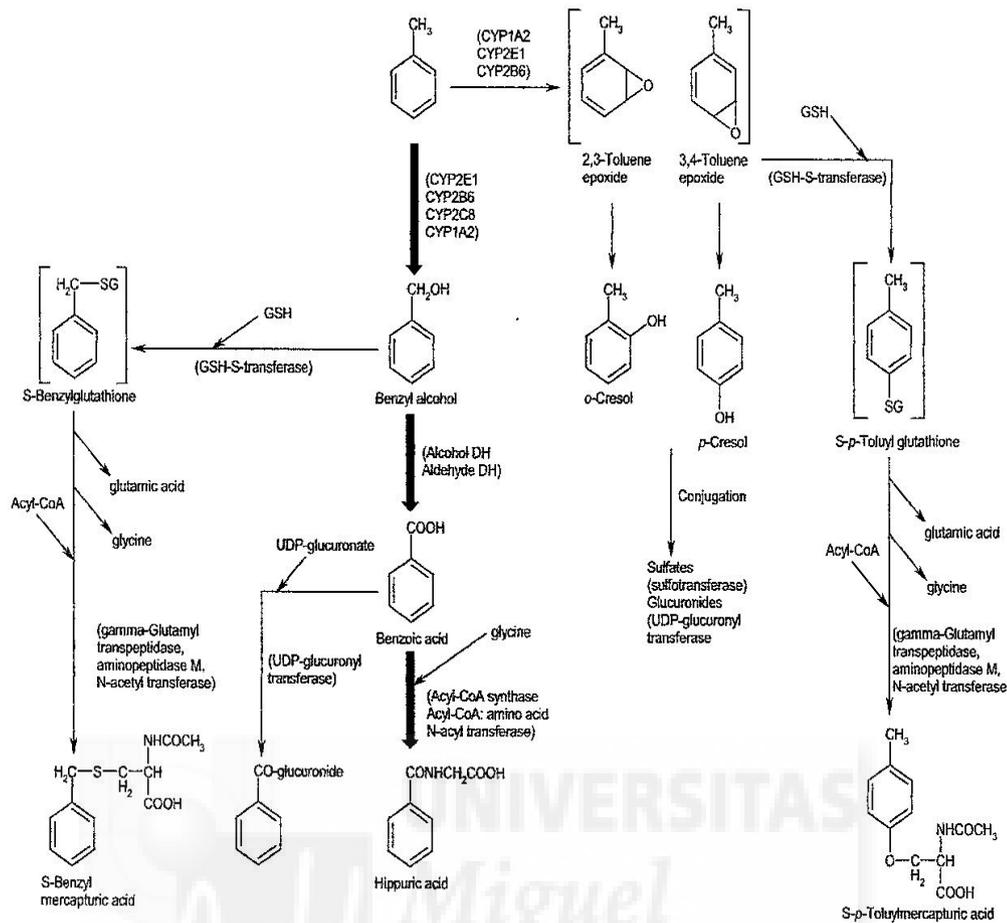


Figura 8. Ruta metabólica del tolueno. Fuente: Agency for toxic substances and disease registry, 2015.

- ELIMINACIÓN Y EXCRECIÓN:

Aproximadamente entre el 7% y el 20% del tolueno absorbido se excreta inalterado por el aire espirado (Carlsson, 1982; Leung y Paustenbach, 1988) (Löf y cols., 1993). El principal metabolito, el ácido hipúrico se elimina por la orina. En condiciones normales de exposición profesional, el ácido hipúrico es eliminado casi enteramente a las 24 horas de finalizada dicha exposición (OMS sección de informes técnicos, 1992).

La excreción del tolueno es relativamente rápida, si bien se puede producir un aumento gradual de la carga de tolueno en el organismo a causa de la

exposición diaria durante la semana laboral (DFG, 1996; INSHT, 2007). La concentración de ácido hipúrico en la orina se ha utilizado como parámetro de monitorización biológica en la evaluación de la exposición al tolueno. Sin embargo, el ácido hipúrico también aparece en la orina humana en cantidades significativas a causa de otras fuentes, tales como la alimentación o el metabolismo normal, de tal modo que este parámetro no sirve en Europa para detectar con fiabilidad la exposición laboral al tolueno cuando las concentraciones en aire de dicha sustancia en el lugar de trabajo se encuentran por debajo de 100 ppm (384 mg/m³) (Lauwerys, 1983). Se dispone de una serie de métodos alternativos, incluyendo las concentraciones de o-cresoles en la orina, que han demostrado su buena correlación con la exposición al tolueno (Truchon y cols., 1996).

Bajo condiciones en las cuales la principal vía de metabolismo del tolueno esté inhibida por una exposición a otra sustancia como el etanol, el tolueno exhalado sin metabolizar será la principal ruta de excreción (Baelum y cols., 1993)

No se han reportado estudios sobre la eliminación del tolueno después de una exposición oral (Agency for toxic substances and disease registry, 2015).

1.4.1.3. Toxicodinamia

Los órganos designados críticos para el tolueno son el sistema nervioso central, y tejido adiposo, debido a la mayor acumulación de tolueno en tejidos ricos en lípidos (Intox, 98).

En un estudio se determinó que la exposición al tolueno no altera el contenido total de fosfolípidos y colesterol a nivel de la membrana celular cerebral en ratas. La razón entre el contenido en fosfolípidos y colesterol es un índice indirecto de la fluidez de la membrana, y esta razón no cambia frente a la exposición a tolueno, por lo que se sugiere que el tolueno no afecta a dicha fluidez. (Carl y cols., 2006).

En un estudio in vitro, la exposición de tolueno de las mitocondrias aisladas de hígado de rata a una concentración de 0,5-2,5 mM causó un aumento en la velocidad de la respiración mitocondrial, sugiriendo que este disolvente desacopla el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, produciendo una depleción de ATP mitocondrial, mientras que a 5 mM causó una fuerte inhibición de la respiración mitocondrial, sugiriendo así una pérdida completa de la función mitocondrial asociada a la de energía. Se examinaron los efectos de la adición de concentraciones crecientes de tolueno a una mitocondria estimulada previamente para la acumulación de Ca^{+2} , observándose la liberación de este ión que coincide con el aumento de la velocidad de respiración. El efecto desacoplador del tolueno observado, pone en peligro las funciones vitales de la célula, en especial en órganos que muestran una alta demanda de energía, como el cerebro y el hígado, principales blancos toxicológicos del tolueno en humanos. (Pérez y Miranda, 2014)

Se sabe que la inhibición de la cadena respiratoria usualmente aumenta la generación de ERO's. Se considera que el tolueno es capaz de causar desarreglos en las membranas celulares, seguido de la producción de superóxidos (Revilla, 2008).

1.4.1.4. Efectos tóxicos

El tolueno actúa como depresivo del sistema nervioso central (SNC) tanto para los animales como para los seres humanos.

El tolueno líquido provoca cierta irritación de la piel y de los ojos por contacto directo, y la gravedad de los efectos depende de la duración de la exposición. Los vapores de tolueno en el aire provocan síntomas de irritación ocular y del tracto respiratorio superior en seres humanos; el conjunto de datos disponibles sobre estos efectos apuntan a un umbral de irritación situado en aproximadamente 75-80 ppm (288-300 mg/m^3). El tolueno no presenta propiedades de sensibilización de la piel o del tracto respiratorio (INSHT, 2007).

Una única exposición a una concentración muy elevada de tolueno en aire, del orden de miles de ppm, durante un periodo de varias horas, puede provocar una depresión pronunciada del sistema nervioso central (SNC), narcosis e incluso la muerte. La exposición única de seres humanos voluntarios a concentraciones de 75-150 ppm (288-576 mg/m³) durante varias horas produjo síntomas de perturbaciones del SNC, tales como mareos, cefaleas y fatiga, así como deficiencias de rendimiento en ensayos de comportamiento neurológico; en estos estudios se registró un NOAEL de 40 ppm (153 mg/m³), (Andersen y cols., 1983; Echeverría y cols., 1989; Baelum y cols., 1985). En cuanto a los efectos de una exposición repetida por inhalación, en los ensayos convencionales con animales no se han observado pruebas significativas de toxicidad tras periodos repetidos y prolongados de exposición a concentraciones de hasta 300 ppm (1.149 mg/m³) al menos. Se ha observado alguna irritación del epitelio nasal en ratas expuestas repetidamente a 600 ppm de tolueno y, a niveles de exposición aún mayores (del orden de 1.000 ppm, 3.830 mg/m³ y superiores), el efecto tóxico más notable observado consistió en la pérdida de agudeza auditiva, detectada en ratas (la única especie experimental en la que se ha estudiado este fenómeno) y provocada por lesiones en la cóclea. Se ha producido la excitación y/o depresión del SNC y la muerte en roedores sometidos a exposiciones repetidas a 1.500 ppm (5.745 mg/m³) y superiores (DFG, 1996; INSHT 2007).

1.4.1.5. Estudios de toxicidad

En general, existe un número considerable de estudios disponibles acerca de los efectos de la exposición repetida al tolueno en los seres humanos, tanto en investigaciones realizadas en lugares de trabajo como en ensayos con voluntarios; sin embargo, muchos de los primeros trabajos efectuados resultan de poca utilidad para la determinación de la toxicidad del tolueno, dado que los trabajadores estaban expuestos de forma significativa a otras sustancias tóxicas, incluyendo la contaminación por benceno del tolueno. El principal objetivo de investigación ha consistido en explorar la sintomatología y los resultados de ensayos de rendimiento que pudiesen indicar posibles efectos

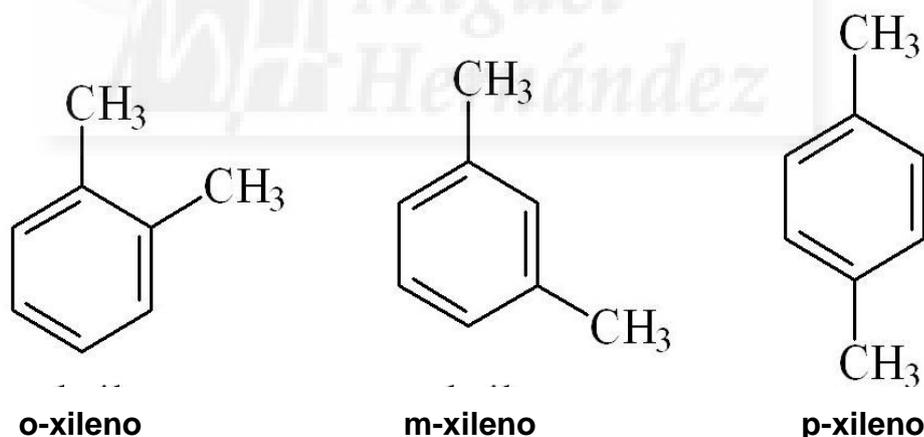
sobre el sistema nervioso central. Se dispone de varios ensayos de este tipo, donde se analizan los efectos de exposiciones repetidas de 4-8 horas a concentraciones de tolueno del orden de 60-80 ppm (230-306 mg/m³); no se observaron efectos sobre el rendimiento, en lo que respecta al manejo de controles (Echeverría y cols., 1989). En algunos, pero no en todos estos ensayos, los sujetos expuestos al tolueno indicaron diversos síntomas no específicos tales como fatiga. A niveles mayores de exposición, del orden de 90-150 ppm (345-576 mg/m³), se han detectado en diversos ensayos bajadas en los resultados de las pruebas de rendimiento y síntomas de mareos, cefaleas e irritación de la membrana mucosa (Stewart y cols., 1975; Dick y cols., 1984; Baelum y cols., 1985; Echeverría y cols., 1989; Foo y cols., 1990 y 1993). Otros ensayos disponibles resultan difíciles de interpretar, en lo que respecta a distinguir entre niveles con “efectos” y “sin efectos”, dada la incertidumbre de la relación entre los efectos supervisados, los niveles de exposición vigente medidos y los niveles de exposición previamente sufridos por los trabajadores (Iregren, 1982; Orbaek y Nise, 1989; Van Thriel y cols., 2000).

El tolueno dio resultados negativos en los ensayos de carcinogénesis en animales, y no hay dato alguno que haga pensar que posee potencial carcinógeno (Gibson y Hardisty, 1983). Con respecto a efectos potenciales sobre la reproducción, existe un número considerable de estudios disponibles en animales de laboratorio. En dichos estudios, no aparece ningún resultado que confirme posibles efectos del tolueno sobre las gónadas o sobre la fertilidad. Se han llevado a cabo numerosos estudios de toxicidad en el desarrollo, con una tendencia global en los resultados a que el tolueno no expresa teratogenicidad. En cuanto a su embriotoxicidad y fetotoxicidad, tampoco hay pruebas de que el tolueno exprese tal actividad en ratones o en conejos. En ratas, existe algún dato acerca de efectos leves, pero únicamente a niveles de exposición superiores a 400 ppm (1.532 mg/m³), es decir, a niveles muy próximos a aquellos que producen toxicidad maternal (Roberts y cols., 1993). Mediante un cuestionario, Ng y cols., (1992) observaron un aumento en la tasa de abortos en 105 embarazos de 55 mujeres expuestas al tolueno en Singapur. La exposición promedio fue de 88 ppm (337 mg/m³) con

un margen de variación de 50 a 150 ppm (de 192 a 576 mg/m³). La tasa de abortos en el grupo con mayor exposición fue de 12,4%, comparado con una tasa de 2,9% en el grupo menos expuesto y de 4,5% en el grupo no expuesto. Los autores excluyeron diversos datos confusos de su estudio e indicaron que la tasa de abortos en Singapur se situaba entre un 5% y un 10%, dato basado asimismo en cuestionarios. Los autores consideraron que sus observaciones eran relevantes, si bien se precisaban estudios más completos para poder corroborarlas. No se han descrito abortos tras casos de exposición accidental elevada o de abuso de tolueno en mujeres embarazadas (Wilkins-Haug y Gabow., 1991). Por todo ello, se concluye que un límite de exposición de 50 ppm (192 mg/m³) protegería también contra su posible fetotoxicidad.

1.4.2 .XILENO

1.4.2.1. Generalidades, usos y propiedades



Sinónimos: (1,2-Dimetilbenceno, 1,3-Dimetilbenceno, 1,4-Dimetilbenceno), (o-xilol, m-xilol, p-xilol)

Fórmula química: C₆H₄(CH₃)₂

Masa Molecular: 106,2 g/mol

El xileno, xilol o dimetilbenceno, es un derivado dimetilado del benceno. Según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico, se diferencia

entre orto-, meta-, o para- xileno (o con sus nombres sistemáticos 1,2-dimetilbenceno; 1,3-dimetilbenceno y 1,4-dimetilbenceno). Se trata de líquidos incoloros e inflamables con un característico olor dulzón. El producto comercial que denominamos genéricamente xileno, es una mezcla de un 60-70% de m-xileno, 10-25% de p-xileno, 10-20% de o-xileno, 5-10% etilbenceno y pequeñas cantidades de otros hidrocarburos, aunque estas proporciones pueden variar en función del suministrador (Arana y cols., 2010)

La diferenciación de los tres xilenos isómeros tuvo lugar en 1867 con los trabajos de Rudolph Fittig, ya que anteriormente se conocía una mezcla compleja de los tres, mezcla que fue descubierta por Auguste Cahours en 1850 en el aceite que se separa al añadir agua al espíritu de madera bruto. El o-xileno fue obtenido por primera vez por Bieber y Fittig, El m-xileno fue descubierto por Fittig y Velguth. El p-xileno fue descubierto por Glinzer y Fittig.

El xileno también se encuentra naturalmente en el petróleo y alquitrán, y se produce en cantidades pequeñas durante incendios forestales. Es una de las 30 sustancias químicas más producidas en Estados Unidos en términos de volumen. (Agency for toxic substances and disease registry, 2007).

- USOS

Se usa principalmente como disolvente en la imprenta e industrias de caucho y cuero. Junto con otros disolventes, el xileno también se utiliza como agente para limpiar, para diluir pinturas y en barnices. También se usa, aunque en menor grado, en las industrias química, de plásticos y de fibras sintéticas y como ingrediente en revestimiento de telas y papeles. Los isómeros del xileno se usan en la manufactura de ciertos polímeros como son los plásticos. Cantidades pequeñas de xileno se encuentran en combustible de aviones y en la gasolina.

- PROPIEDADES FÍSICAS

Meta-xileno

Punto de ebullición: 139°C

Punto de fusión: -48°C

Densidad relativa del líquido (agua = 1g/ml): 0.86 g/ml

Presión de vapor (kPa a 20°C): 0.8

Densidad relativa de vapor (aire = 1g/ml): 3.7 g/ml

Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1g/ml): 1.02g/ml

Punto de inflamación: 27°C

Temperatura de autoignición: 527°C

Límites de explosividad (% en volumen en el aire): 1.1-7.0

Coefficiente de reparto octanol/agua: 3.20

Orto-xileno

Punto de ebullición: 144° C

Punto de fusión: -25° C

Densidad relativa del líquido (agua = 1 g/ml): 0.88 g/ml

Presión de vapor (kPa a 20° C): 0.7

Densidad relativa del gas (aire = 1g/ml): 3.7 g/ml

Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1g/ml): 1.02 g/ml

Punto de inflamación: 32° C

Temperatura de autoignición: 463° C.

Coefficiente de reparto octanol/agua: 3.12

Para-xileno

Punto de ebullición: 138°C

Punto de fusión: 13°C

Densidad relativa (agua = 1): 0.86

Presión de vapor (kPa a 20°C): 0.9

Densidad relativa de vapor (aire = 1g/ml): 3.7 g/ml

Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1g/ml): 1.02 g/ml

Punto de inflamación: 27°C

Temperatura de autoignición: 528°C

Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 1.1-7.0

Coefficiente de reparto octanol/agua: 3.15

- PROPIEDADES QUÍMICAS

Solubilidad: es insoluble en agua (0,2 g/l), soluble en alcohol, éter y otros compuestos orgánicos.

El xileno es estable bajo condiciones ambientales normales y en condiciones previsibles de temperatura y presión durante su almacenamiento y manipulación.

Existe posibilidad de reacciones fuertes con comburentes, ácido nítrico, ácido sulfúrico, azufre

- NIVELES DE TOXICIDAD DEL XILENO

INGESTION ORAL:

m-Xileno: LD50 = 4300 mg/kg en ratas

mezcla de isómeros: LD50 = 2100 mg/kg en rata,

o-Xileno: LD50 = 5000 mg/kg en rata.

ABSORCION POR LA PIEL:

m-Xileno: LD50 = 1134 mg/kg en conejos.

mezcla de isómeros: 1100 mg/kg conejos.

INHALACION:

Mezcla de isómeros: CL50= 11 mg/l (4 horas) en rata.

Concentración mínima letal en el aire (18 horas): 10000 ppm (43436 mg/m³)

La inhalación de concentraciones de 434-2997 mg/m³ (100-690 ppm) pueden producir efectos leves en la memoria.

1.4.2.2. Toxicocinética

- ABSORCIÓN:

Los xilenos se absorben bien a través de los pulmones (Riihimäki y cols., 1979). La absorción de xileno en los pulmones después de 8 horas de exposición es del 60-65% de la cantidad inhalada (Sedivec and Flek, 1976; Riihimäki y cols., 1979; Astrand y cols., 1978) y no depende ni de la concentración ambiental, ni de la ventilación pulmonar, aunque sí, de los parámetros fisiológicos del trabajador. Los xilenos líquidos presentan una buena absorción cutánea (Engström y cols., 1977), y un pequeño porcentaje del vapor se absorbe también por esta vía (Riihimäki y Pfäffli, 1978).

La absorción gastrointestinal no está estudiada. Existe poca información sobre la absorción del xileno después de la ingestión en humanos y animales. Un estudio en el que se determinó la excreción de metabolitos urinarios indicó que se había producido la absorción después de dosis orales de 40 o 80 mg/kg de o-xileno o m-xileno en seres humanos. Aunque la absorción no se cuantificó, se demostró que al menos 34% de o-xileno y 53% de m-xileno se habían absorbido en dosis administradas de 40 mg/kg (Ogata y cols., 1979).

Resultados de estudios experimentales indican que el m-xileno se absorbe tras exposición dérmica. Aunque el grado de absorción a través de la piel no es tan grande como el que resulta de la inhalación (Engstrom y cols., 1977). Para el m-xileno la absorción es de $2\text{mcg}/\text{cm}^2/\text{min}$ (Arana y cols., 2010).

- DISTRIBUCION:

Tanto en humanos como en animales, el xileno se deposita en los tejidos grasos después de la exposición por inhalación (Carlsson, 1981). Sus propiedades lipofílicas son las responsables de su acumulación en el sistema nervioso central (Horowitz, 2001).

El equilibrio de distribución entre la sangre y los tejidos se alcanza a las 6 horas excepto en el tejido adiposo en donde puede ser de varios días. (Arana y cols., 2010). No se han localizado estudios sobre la distribución de xileno en humanos, después de la exposición oral y dérmica.

- METABOLISMO:

Los xilenos se depositan en el tejido adiposo (Sedivec y Flek, 1976; Riihimäki y cols., 1979), de donde se eliminan lentamente. La velocidad de eliminación depende del contenido en grasa y de la perfusión (Riihimäki y cols., 1979), (Riihimäki y Savolainen, 1980).

A los niveles de exposición que se suelen encontrar en los lugares de trabajo, el metabolismo es un proceso de primer orden y la relación entre la exposición y la concentración de metabolitos en orina es lineal (Sedivec y Flek, 1976; Ogata y cols., 1970).

El alcohol (Riihimäki y cols., 1982) y la aspirina (Campbell y cols., 1988) inhiben el metabolismo del xileno en un 50%. El etilbenceno lo inhibe en un 20% (Engström y cols., 1984). Se han encontrado diferencias entre el metabolismo de los xilenos en humanos y en animales de experimentación, que pueden ser debidas a las diferentes dosis utilizadas en los estudios. La principal diferencia es la producción de p-metilbenzaldehído catalizada por el alcohol dehidrogenasa del pulmón e hígado en roedores y conejos (Carlone y Fouts, 1974; Smith y cols., 1982). La glucuronoconjugación, aparentemente ocurre cuando se satura el mecanismo de conjugación con glicina, que es el predominante en humanos, como lo pone de manifiesto la presencia de ácidos metilhipúricos en orina. Estos ácidos representan más del 95% de la fracción metabolizada del xileno. (Sedivec y Flek, 1976).

La hidroxilación del anillo aromático puede ocurrir también en el hombre, sin embargo los xilenoles producidos representan menos del 2% del xileno absorbido. (Sedivec y Flek, 1976).

La hidroxilación del anillo aromático con la formación de dimetilfenoles parece ser una vía menor en seres humanos. Se han identificado los siguientes isómeros dimetilfenol en orinas humanas: 2,3 y 3,4-dimetilfenol (con o-xileno), 2,4-dimetilfenol (con m-xileno) y 2,5-dimetilfenol (con p-xileno) (Sedivec y Flek, 1976; Engstrom y cols., 1977)

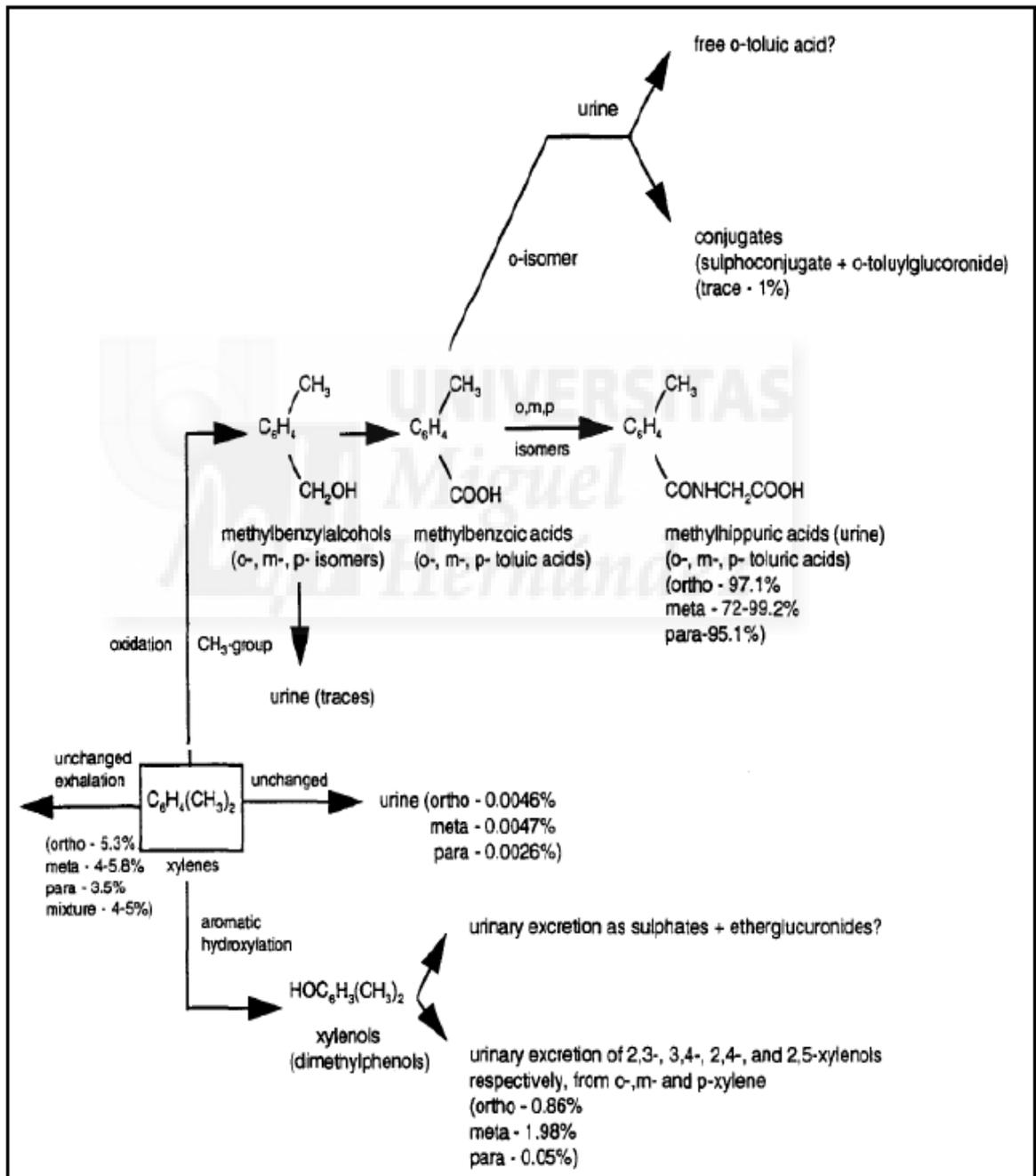


Figura 9. Ruta metabólica del xileno. Fuente Pérez y Miranda, 2014

- ELIMINACIÓN:

Los xilenos se eliminan inalterados en el aire exhalado y como metabolitos en la orina.

La vía principal de eliminación es la renal, en forma de ácidos metilhipúricos (orto, meta y para). Esta excreción urinaria se correlaciona bien con la exposición y no se observan diferencias relacionadas con el sexo. (Inoue y cols., 1993)

La eliminación de xileno inalterado en la orina es despreciable. Después de 8 horas de exposición entre el 3% y el 6% de la cantidad absorbida se elimina inalterado en el aire exhalado. La concentración disminuye muy rápidamente durante las tres primeras horas posteriores a la exposición, para disminuir mucho más lentamente después. La eliminación parece ser bifásica con vidas medias de 1 y 20 horas para las dos fases (INSHT, 2011).

La eliminación urinaria de ácidos metilhipúricos supone el 95% de la cantidad de xilenos absorbida. La eliminación es también bifásica con vidas medias de 3,6 y 30 horas (INSHT, 2011).

Menos del 1% de la cantidad de xilenos absorbida se elimina como xilenoles conjugados con ácido mercaptúrico (INSHT, 2011).

Algunos estudios han mostrado la eliminación de m-xileno líquido absorbido vía dérmica en humanos tras una exposición de 15 minutos a través del aire exhalado y de la orina (Engstrom y cols., 1977; Riihimaki, y cols., 1979)

1.4.2.3. Toxicodinamia:

La toxicidad observada en el sistema nervioso central durante la exposición a altas concentraciones de xileno, se ha atribuido a su liposolubilidad en la membrana neuronal (EPA, 2003). Se han observado cambios en los niveles de

varios neurotransmisores y en la composición de lípidos en varias áreas del cerebro durante una exposición aguda e intermitente al xileno. (Andersson, Fuxe y cols., 1981). No está claro si éstos representan efectos directos del xileno o son cambios secundarios resultantes de una acción inespecífica de la depresión del sistema nervioso central. Algunos autores han sugerido también que los intermediarios metabólicos como el metilbenzaldehído, pueden ser responsables de los efectos tóxicos del xileno (Savolainen y Pfaffli, 1980).

1.4.2.4. Efectos tóxicos

No se han descrito diferencias en la toxicocinética o toxicodinámica de los distintos isómeros del xileno. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con xileno de calidad técnica. A la hora de interpretar los estudios, es importante tener en cuenta que la mezcla de xilenos, utilizada en las primeras experimentaciones con animales y a la que los trabajadores estuvieron expuestos, contenía probablemente pequeñas cantidades de benceno, que pueden ser las responsables de la toxicidad hematopoyética descrita en algunas investigaciones. Los efectos críticos del xileno son la irritación y los efectos sobre el sistema nervioso central. Puede producir irritación de los ojos y las membranas mucosas a concentraciones inferiores a 200 ppm y narcosis a concentraciones superiores (OSHA, 1978; AIHA; 1978; Proctor y cols., 1988). Se han descrito irritaciones leves de los ojos y del tracto respiratorio superior en algunos sujetos expuestos a xileno durante 15-30 minutos a un nivel de 100 ppm (442 mg/m³) en estudios con voluntarios (Carpenter y cols., 1975; Hastings y cols., 1984). Los síntomas de sus efectos sobre el sistema nervioso central comienzan a aparecer también a niveles de exposición cercanos a 100 ppm (442 mg/m³) (Savolainen y cols., 1979, 1980a+b, 1981; Gamberale y cols., 1978; Olson y cols., 1985). Este valor puede considerarse como un LOAEL.

La exposición crónica a xileno puede causar depresión del sistema nervioso central, anemia, hemorragia en las mucosas, hiperplasia en la médula ósea, aumento del tamaño del hígado y nefrosis. El contacto repetido con la piel produce sequedad y dermatitis (OSHA, 1978; Clayton and Clayton., 1981).

1.4.2.5. Estudios de toxicidad

Algunos estudios de población humana han sugerido una conexión entre la exposición a solventes orgánicos incluyendo el xileno y una tasa de aumento de abortos o defectos de nacimiento en niños. Sin embargo, en la mayoría de los casos en los que se presentaron, hubo exposición a una variedad de solventes al mismo tiempo. Las exposiciones fueron definidas como efectos secundarios, y el número de casos examinados fue pequeño. Generalmente, no se pueden hacer conclusiones de los efectos de exposición al xileno en niños nonatos debido a la insuficiencia de información disponible. En animales de experimentación, el xileno produjo efectos fetotóxicos (osificación retrasada y efectos comportamentales), en ausencia de toxicidad materna. La información animal sugiere que el xileno no es teratogénico o embriotóxico a niveles de exposición que no sean nocivos para la madre. (HSDB, 2016) .

Se investigó la posible carcinogenicidad del xileno (mezcla de o-xileno, m-xileno y p-xileno) utilizando para ello, en diferentes estudios, una cepa de ratones y dos cepas de ratas. El estudio en que se utilizaron ratas, los resultados se considerarn inadecuados para ser evaluados, y en el estudio realizado sobre ratones, no se detectó aumento de la incidencia de tumores. No existen datos sobre estudios en los que se utilice los isómeros del xileno individualmente. (IARC, 1999).

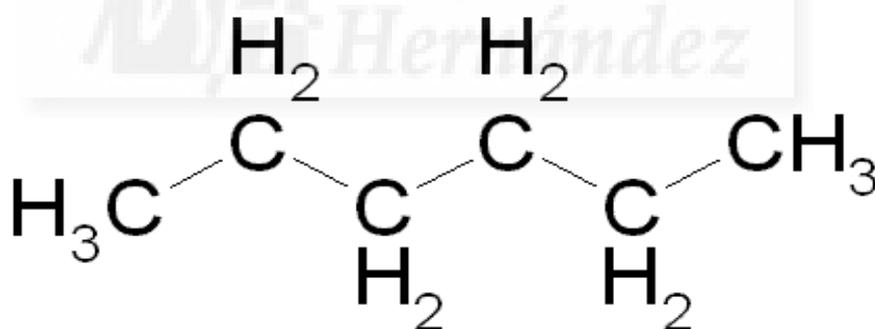
La inhalación y la exposición oral a meta-xileno induce la actividad del citocromo P450 principalmente de la de CYP2B1, así como las actividades de UDP-glucuronosiltransferasa, DT-diaforasa y glutatión S-transferasa (Savolainen y cols., 1978; Toftgård y cols., 1982; Elovaara y cols., 1989; Raunio y cols., 1990; Gut y cols., 1993). Por otro lado, la exposición por inhalación a corto plazo (≥ 75 ppm/24 h) condujo a una disminución de la actividad del citocromo P450 en el pulmón de rata (Elovaara y cols 1987). La exposición a p-xileno mediante inhalación en ratones (tipo C3H / HeJ) (1200 ppm/6 h por día durante cuatro días), aumento ligeramente los niveles de citocromo P450 hepático (Selgrade y cols, 1993).

Se llevaron a cabo 4 estudios en humanos, en los que se relaciona la exposición a xileno con la aparición de distintos tipos de cancer. En ninguno de los estudios el xileno era el único disolvente estudiado. Los resultados en ninguno de estos estudios fueron significativos de presentar resultados relacionados o asociados a la presencia de xileno en la exposición. (IARC, 1999)

1.4.3. n-HEXANO

1.4.3.1. Generalidades, usos, propiedades

El hexano es un hidrocarburo alifático (alcano) con seis átomos de carbono. Existen varios isómeros de esta sustancia, siendo la más conocida e importante la del n-hexano:



Otros isómeros son: 2-metilpentano (o isohexano), 3-metilpentano, 2,2-dimetilbutano (o neohexano) y 2,3-dimetilbutano. El n-hexano comercial es una mezcla de isómeros de hexano con pequeñas cantidades de ciclopentano, ciclohexano, pentano y heptano. Contiene una cantidad de n-hexano que oscila entre 20% y 80%.

Se trata de un líquido incoloro, fácilmente inflamable y con un olor característico a disolvente. Es poco soluble en agua, pero se mezcla bien con los disolventes orgánicos apolares como el alcohol, el éter o el benceno. Es muy poco polar por lo que su momento dipolar es casi nulo y su fuerza de elución es muy baja ($\epsilon^{\circ}=0,01$). El n-hexano es uno de los pocos alcanos tóxicos.

- USOS

El hexano y sus isómeros forman parte de derivados de petróleos y se obtienen a partir de ellos mediante destilación fraccionada. A menudo no hace falta separar el n-hexano si no se emplea directamente la mezcla obtenida cuyo intervalo de ebullición coincide aproximadamente con el punto de ebullición del hexano.

El n-hexano puro sólo está disponible comercialmente para fines especializados, tales como agente de reacción en laboratorios.

La mayor parte del hexano usado en industria se mezcla con sustancias químicas similares: disolventes. El uso principal de los disolventes que contienen hexano es en la extracción de aceites vegetales de cosechas. También se utiliza como agente de limpieza en imprentas, en industrias textiles, de muebles y de calzado. Ciertos tipos de pegamentos especiales usados en industrias de techado, de zapatos y cueros también contienen hexano. Varios productos de consumo tales como pegamentos de secado rápido y cemento para pegar, contienen hexano. También se utiliza como desnaturizante de alcohol y en termómetros para temperaturas bajas, en lugar de mercurio. Está presente en la gasolina en una concentración máxima del 2%. Puede encontrarse también como trazas en el gas natural (Agency for toxic substances and disease registry, 1999).

- PROPIEDADES FISICAS Y TERMODINAMICAS

Peso molecular: 86,1

Fórmula molecular: C₆H₁₄

Sinónimos: Hexano normal. Hidruro de hexilo

Composición: C: 83.62 %, H: 16.38 %.

Punto de ebullición: 69°C

Punto de fusión: -95.6°C

Densidad (g/ml): 0.66 (a 20°C)

Índice de refracción (20°C): 1.38

Presión de vapor (a 15.8°C): 100 mm de Hg

Temperatura de autoignición: 223°C

Límites de explosividad (% en volumen en el aire): 1.2-7.7

Densidad de vapor (aire=1): 3

Punto de inflamación (flash point): -21.7°C

Temperatura de autoignición: 225°C

- PROPIEDADES QUIMICAS

Solubilidad: insoluble en agua, (0,0076 g/ml), soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y muy soluble en alcohol.

Productos de descomposición: monóxido y dióxido de carbono.

Reacciona vigorosamente con materiales oxidantes como cloro, fluor o perclorato de magnesio.

- NIVELES DE TOXICIDAD

RQ: 1 IDLH: 5000 ppm IDLH: 3878 mg/m³ (1100 ppm) para 30 minutos.

Toxicidad: DL50 Oral: 28710 mg/Kg, en ratas. Produce irritación en los ojos en conejos, 10 mg promedio. Investigado como tumorígeno y mutagénico y con efectos reproductivos.

El n-hexano es uno de los pocos alcanos tóxicos. El efecto fisiológico no se debe a la misma sustancia sino a los productos de su metabolización, especialmente la 2,5-hexadiona. Este compuesto reacciona con algunas aminas esenciales para el funcionamiento de las células nerviosas. Por lo tanto es neurotóxico. Además posee potencial adictivo y es peligroso.

1.4.3.2. Toxicocinética

- ABSORCIÓN:

La exposición profesional al hexano está relacionada principalmente con el uso de adhesivos, a menudo en tareas de pequeña escala sin registro de los niveles de exposición. Es por ello que se considera que el n-hexano puede penetrar principalmente en el organismo por dos vías: por inhalación o a través de la piel. Sea cual sea la vía, la absorción es lenta.

Se absorbe mal a través del sistema gastrointestinal. Pero se ha sugerido que también existe absorción, debido a la identificación de metabolitos de n-hexano en aire, sangre y orina después de la exposición oral a este disolvente. (Baelum y cols, 1998). Krasavage y cols. (1980) mostraron mayores niveles de 2,5-hexanodiona en suero de ratas expuestas al n-hexano por sonda de alimentación gástrica. Además, la neurotoxicidad observada después de la exposición oral de ratas al n-hexano también sugiere la absorción gastrointestinal del n-hexano (Ono y cols., 1981; Krasavage y cols., 1980).

La absorción alveolar del n-hexano es mayor en individuos obesos. Aunque la tasa de captación alveolar disminuye durante el ejercicio físico, la absorción total de n-hexano aumenta ligeramente como resultado de la mayor tasa de ventilación pulmonar (HSDB, 2013).

La absorción a través de la piel es extremadamente lenta y es limitada (Tsuruta, 1982), pero puede verse favorecida por otros disolventes.

- DISTRIBUCIÓN:

En animales de experimentación, el n-hexano se absorbe y se distribuye rápidamente a través de los pulmones (Dahl y cols., 1988). Se transporta al hígado que es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo. Los metabolitos que se forman en el hígado serán transportados a través de la sangre a distintos órganos y tejidos incluyendo el propio hígado, los riñones, y cerebro. (EPA, 2005).

No existen estudios que investiguen la distribución del n-hexano después de exposición oral en humanos ni en animales de laboratorio. (EPA, 2005).

Veulemans y cols. (1982), midieron los niveles de n-hexano en sangre a varios intervalos después de la exposición en humanos (en reposo y con actividad física), (102 y 204 ppm durante 4 horas). Los niveles en sangre rápidamente disminuyeron en los 10 primeros minutos y permanecieron estables durante 100 minutos. La vida media de n-hexano fue establecida en 1,5-2 horas. (EPA, 2005).

Bus y cols (1979) monitorizaron la distribución de n-hexano en ratas preñadas que habían sido expuestas, vía inhalatoria, a 1000 ppm de n-hexano. Después de 6 horas de exposición, la concentración de n-hexano fue medida en sangre, hígado, riñones, cerebro y feto, obteniendo la máxima concentración en riñones (6,33 mcg/ml). La concentración obtenida en sangre fue de 0,45 mcg/ml (EPA, 2005).

El coeficiente de distribución de n-hexano es aproximadamente 0,8-1,0 entre sangre y aire a 27°C y los niveles máximos en sangre se producen en menos de 1 hora después de la inhalación o exposición percutánea. De hecho, las medidas de la concentración en equilibrio de n-hexano en el aire espirado han demostrado el paso de los pulmones a la sangre de una fracción del n-hexano inhalado de entre el 5,6 y el 15 %. Hay una relación lineal entre la concentración en sangre venosa y la concentración en aire alveolar.

En su distribución alcanza el sistema nervioso central y periférico. Se han encontrado niveles especialmente elevados en los nervios periféricos (Baker y Rickert, 1981). También se ha encontrado en bazo, hígado y hueso. El n-hexano tiene gran afinidad por los tejidos ricos en lípidos. La acumulación de n-hexano en estos tejidos dependerá de la concentración de lípidos en ellos. Se acumulan 4 mg de hexano por gramo de lípidos.

En hígado no se llega a alcanzar el equilibrio sino que sigue aumentando la acumulación de n-hexano mientras se acumule simultáneamente lípidos en ese órgano (Jorgensen y Cohr, 1981).

- METABOLISMO:

El metabolismo del n-hexano ocurre principalmente en el hígado. Se ha estudiado en animales de experimentación que durante el primer paso del metabolismo oxidativo por el citocromo P-450, los carbonos 1,2,3 de la molécula de n-hexano son hidroxilados y forman hexanoles en diferentes proporciones en todas las especies de animales. El n-hexano se metaboliza mediante el sistema de oxidasa de función mixta o monooxigenasas en el hígado formando alcoholes que se conjugan con ácido glucurónico o se convierten en monóxido de carbono. El 1-hexanol y el 3-hexanol son metabolitos menos tóxicos. El primero se oxida a ácido hexanoico que sufre el metabolismo lipídico habitual. El 2-hexanol se puede oxidar a 2-hexanona. Couri y cols. (1978) demostraron que la 2-hexanona puede sufrir oxidaciones en la fracción microsómica y citosólica del hígado, produciéndose 2,5-hexanodiona. Este es el principal metabolito detectado en el plasma sanguíneo y la orina de trabajadores expuestos a n-hexano (Mutti y cols., 1984).

Se han descrito muchos casos de polineuropatía inducida por n-hexano que están fuertemente asociados con su metabolismo (Graham y cols., 1982).

Morohashi y cols., investigaron la contribución de las isoformas de P450 al metabolismo del n-hexano utilizando CYP1A y CYP2B purificados en microsomas hepáticos de ratas. Ambas isoenzimas catalizaron el metabolismo

pero con diferencias: CYP2B1 está involucrada principalmente en el metabolismo de 2-hexanol, seguido de 3-hexanol y de 1-hexanol (siendo la ratio de formación de 1-hexanol aproximadamente la décima parte del 2-hexanol) mientras que CYP2E1 está más involucrada en la formación de 3-hexanol, seguida de 2-hexanol y no cataliza la formación del metabolito 1-hexanol. La contribución del enzima CYP2E1 al metabolismo del hexano no se ha estudiado completamente con enzima purificada pero los estudios realizados sugieren que participa activamente y está reforzado por el ayuno y la ingesta crónica de etanol. (Morohashi y cols., 1983).

El pretratamiento de ratas con el inductor de CYP2E1 aumentó la formación de 2,5-HD a partir de ratas administradas con n-hexano (Robertson y cols., 1989) (Raunio y cols., 1990), lo que sugiere que CYP2E1 es la isoenzima del grupo del P450 más importante y que es la responsable de la biotransformación de n-hexano a 2,5-HD.

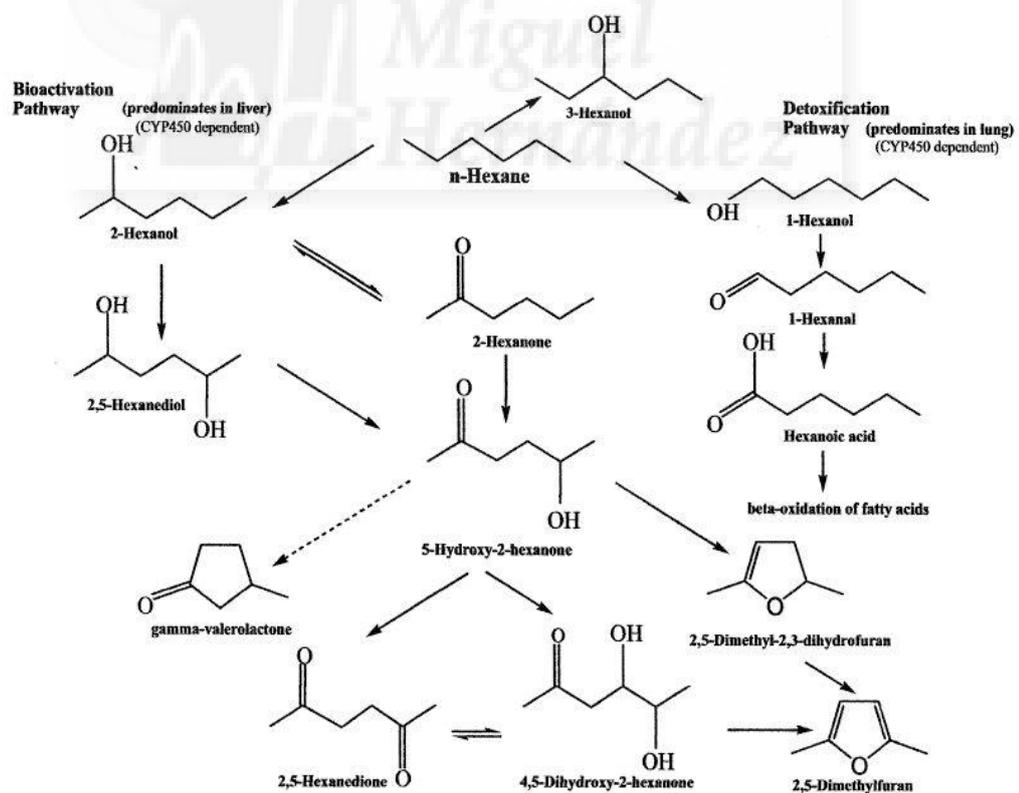


Figura 10. Ruta metabólica de transformación del n-Hexano. Fuente EPA, 2005

- ELIMINACIÓN:

La eliminación del n-hexano puede ocurrir tanto vía respiratoria, inalterado después de la exposición y vía renal, mediante la eliminación de los metabolitos de n-hexano producidos en el proceso metabólico, en orina.

Experiencias realizadas con voluntarios humanos expuestos a concentraciones de n-hexano en el ambiente, revelan que parte del n-hexano inhalado se elimina inalterado vía pulmonar. Mutti y cols. monitorizaron a 10 trabajadores expuestos a n-hexano en una fábrica de calzado y obtuvieron que la eliminación alveolar de n-hexano puede llegar a alcanzar el 10% del total inhalado (EPA ,2005; Mutti y cols., 1984).

En orina no se detecta n-hexano inalterado. El principal metabolito encontrado en orina de personas expuestas a n-hexano es la 2,5-hexanodiona (EPA, 2005). Perbellini y cols. (1981) identificaron, en la orina de 41 trabajadores de calzado expuestos a concentraciones de 11–250 mg/m³ de hexano comercial (mezcla que contiene n-hexano), además de 2,5-hexanodiona, los siguientes metabolitos: 2,5-dimethylfurano, γ -valerolactona, y 2-hexanol

La presencia de 2,5-hexanodiona también es detectada en orina de voluntarios que han sido expuestos a n-hexano vía gástrica (Baelum y cols., 1998)

Las medidas de niveles de 2,5-hexanodiona realizadas en orina tras el turno de trabajo indicaron una correlación positiva tanto con la concentración de n-hexano en aire como con los niveles de n-hexano en sangre, e indican que el n-hexano puede acumularse en el organismo (Mutti y cols., 1984; Perbellini y Bartolucci, 1985; Imbriani y cols., 1984). Cardona y cols. midieron las concentraciones de 2,5-hexanodiona en orina de trabajadores del calzado y observaron que dichas concentraciones tienden a incrementarse durante la semana de trabajo. Así mismo obtuvieron una correlación lineal entre la concentración media ambiental y las concentraciones urinarias del metabolito (Cardona y cols., 1996).

Se cree que la 2,5- hexanodiona es el metabolito responsable de los efectos tóxicos en testículos y sistema nervioso (Chapin y cols., 1983; Graham y cols., 1982).

1.4.3.3. Toxicodinamia.

Para estudiar la distribución del n-hexano y sus metabolitos, Perbellini y colaboradores describieron la construcción de un modelo matemático basado en la toxicocinética fisiológica (PBTK) compuesto por ocho compartimentos funcionalmente descritos del cuerpo (Perbellini y cols., 1990, 1986, 1985). El primero de los compartimentos representa el n-hexano en pulmones; el segundo compartimento corresponde a tejidos altamente vascularizados, el tercero al tejido muscular, el cuarto el tejido graso, el quinto el lugar de metabolización y otros tres compartimentos importantes que se corresponden con biotransformación, agua y compartimentos urinarios. El esquema que se presenta a continuación, muestra el catabolismo del n-hexano, con la producción de 2,5-hexanodiona y su posterior transferencia al agua y a los compartimentos urinarios. Se supone que el producto químico establece instantáneamente un equilibrio entre el aire alveolar y la sangre venosa y que, a continuación se lleva a cabo el equilibrio con cada compartimiento del tejido. En el modelo se considera teóricamente que el hígado es el único sitio en el que se forman metabolitos de n-hexano, y se asume que todas las constantes de velocidad son de primer orden (Perbellini y cols., 1986).

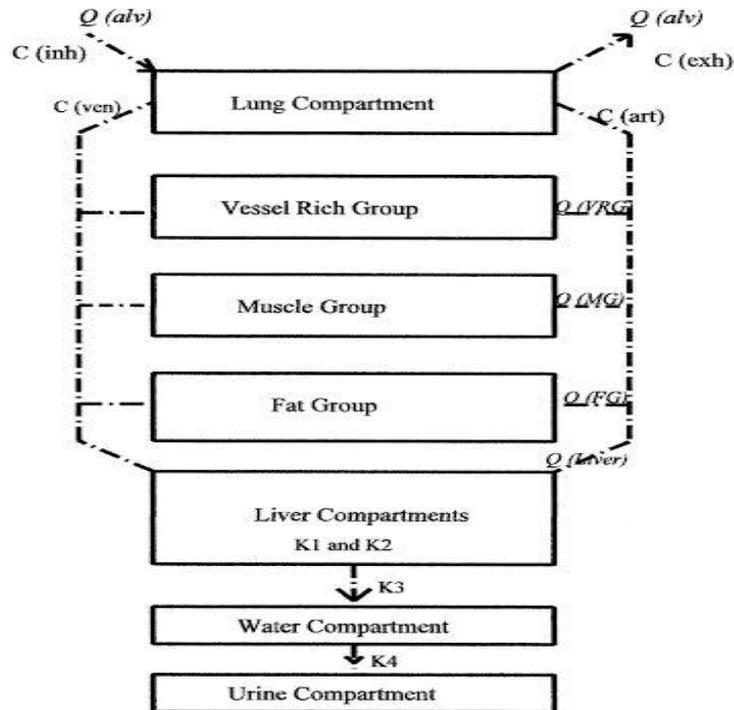


Figura 11. Modelo PBTK para la distribución de n-hexano en el organismo y la excreción urinaria de 2-5 hexanodiona. Fuente: Perbellini y cols., 1986.

La utilidad clave del modelo era simular condiciones ocupacionales que se habían encontrado en fábricas donde se usaban productos conteniendo n-hexano y donde la exposición era constante. Cuando se prolongó la duración hipotética de la exposición a 8 horas, se mostró que la concentración de n-hexano en el compartimento de grasa seguía una tendencia al alza, aunque con amplias fluctuaciones. De forma similar, la concentración de 2,5-hexanodiona en la orina mostraba picos y valles sin caer a niveles insignificantes hasta un punto de tiempo después de la última exposición que representa la última parte del fin de semana. El estudio de Perbellini y cols. (1990), llamó la atención sobre la persistencia del n-hexano en el compartimento de grasa y reportó una semivida de 64 horas en este grupo de tejidos. Esta semivida sugiere que el n-hexano acumulado en la grasa no podría ser completamente excretado antes del comienzo de la siguiente semana de trabajo, y que cerca de la excreción completa de n-hexano en grasa requeriría más de 10 días sin exposición adicional.

Fisher y cols., (1997) utilizaron un modelo PBTK, usando parámetros de humanos y animales publicados para simular la transferencia de 19 sustancias químicas volátiles, incluyendo el n-hexano, de una madre lactante a su bebé durante la lactancia. El modelo se utilizó para estimar la cantidad de producto químico que se transferiría durante la lactancia, asumiendo que la madre reanuda la exposición ocupacional después del parto y el permiso de maternidad. Los niveles de n-hexano en la leche materna se cuantificaron para concentraciones de n-hexano ingeridas. No obstante el método de estudio no ha sido validado para cuantificar en base a niveles de exposición a n-hexano (EPA, 2005).

1.4.3.4. Efectos tóxicos

La exposición a colas y adhesivos conteniendo mezclas de disolventes orgánicos es uno de los riesgos tradicionalmente presentes en el sector del calzado. El n-hexano es uno de esos disolventes y se ha identificado como el responsable de la enfermedad conocida como "parálisis del calzado".

En la fabricación del calzado se utilizan materias primas con un gran contenido en disolventes de carácter orgánico, los cuales constituyen la principal fuente de riesgos tóxicos. La composición de los adhesivos en los procesos de pegado, así como la mezcla de disolventes utilizadas en otros procesos como el difumino es muy variada y repercute en su potencial toxicidad. En nuestro ámbito geográfico, la Comunidad Valenciana y dentro de ella, la provincia de Alicante, el sector del calzado es muy representativo tanto por el número total de empresas que abarca como por el número de trabajadores empleados.

Entre los disolventes más utilizados en el proceso de fabricación del calzado destaca el n-hexano por el efecto neurotóxico del cual es responsable precisamente su transformación a nivel biológico en su principal metabolito, la 2,5-hexanodiona (2,5-HD), que provoca una polineuropatía conocida familiarmente en nuestro medio como la "parálisis del calzado". El término correcto para denominar esta patología es el de polineuropatía desmielinizante

de origen tóxico por n-hexano (Spencer y Schaumburg, 1976). En 1970 se producen en España los primeros casos de polineuropatías en Alicante. Posteriormente, en Girona (14 casos en 1972), Zaragoza (23 casos en 1973), Murcia (2 episodios en 1980 y 1985), Mallorca (1987). En 1994 se declararon dos brotes, uno en Aragón y otro en la Rioja. El brote de polineuropatía detectado más recientemente es el de 10 trabajadoras de una fábrica de zapatos de Villena (Alicante) en el año 1998. Otros dos brotes fueron detectados este mismo año, meses antes, en Barcelona y Albacete. El diagnóstico es clínico y electromiográfico y la sintomatología remite al cesar la exposición al tóxico (Pastore y cols., 2002).

Los efectos agudos o crónicos se producen casi siempre por inhalación. El hexano exhibe una toxicidad aguda tres veces mayor que el pentano. Los efectos agudos se producen por exposición a altas concentraciones de vapor de n-hexano y van desde mareo después de una exposición breve a concentraciones de aproximadamente 5.000 ppm, hasta convulsiones y narcosis observadas en animales a concentraciones de aproximadamente 30.000 ppm. En el ser humano, la exposición durante 10 minutos a una concentración de 2.000 ppm (0,2 %) no produce síntomas. La exposición a 880 ppm durante 15 min puede causar irritación de los ojos y el tracto respiratorio superior (EPA, 2005)

Los efectos crónicos se producen por exposición prolongada a dosis que no producen síntomas agudos aparentes y tienden a desaparecer lentamente cuando finaliza la exposición. A finales del decenio de 1960 y principios del decenio de 1970, se detectaron algunos brotes de polineuropatías sensorimotoras y sensoriales en trabajadores expuestos a mezclas de disolventes que contenían n-hexano en concentraciones de entre 500 y 1.000 ppm, con algunos picos mayores y algunos casos de sintomatología con concentraciones de tan sólo 50 ppm. Se observaron también algunos casos de atrofia muscular y afectación de nervios craneales, con trastornos visuales y parálisis facial. Aproximadamente un 50 % mostró desnervación y regeneración de los nervios. También se notificó sensación de hormigueo, entumecimiento y debilidad de las extremidades, principalmente en las piernas. A menudo se

observó marcha vacilante. Los reflejos del tendón de Aquiles desaparecieron; la sensación de tacto y calor disminuyeron. El tiempo de conducción se redujo en los nervios motores y sensoriales de brazos y piernas.

El curso de la enfermedad es, en general, muy lento. Después de la aparición de los primeros síntomas, suele producirse un deterioro del cuadro clínico por agravamiento de la deficiencia motora de las regiones afectadas en un principio y su extensión a aquellas que hasta entonces se habían mantenido intactas. Este deterioro puede persistir varios meses después de haber cesado la exposición. La lesión suele extenderse de los miembros inferiores a los superiores. En casos muy graves aparece parálisis motora ascendente con deficiencia funcional de los músculos respiratorios. La recuperación puede durar entre 1 y 2 años; generalmente es completa, aunque en algunos casos persiste la disminución de los reflejos tendinosos, en particular los del tendón de Aquiles pese a un estado de salud aparentemente bueno.

En casos graves de intoxicación con n-hexano, se han observado síntomas en el sistema nervioso central (defectos de la función visual o de la memoria) relacionados con una degeneración del núcleo visual y las estructuras hipotalámicas, que pueden ser permanentes. (EPA, 2005)

1.4.3.5. Estudios de toxicidad

El n-hexano tiene una baja toxicidad aguda, con un LC50 (a una hora) de 77.000 ppm (276 g/m³) en ratas (Pryor y cols., 1982). Aparentemente, los efectos críticos del n-hexano son la toxicidad testicular y neurotoxicidad (tanto en el sistema nervioso central como en el periférico). La exposición de ratas a 5.000 ppm (17.900 mg/m³) produjo efectos testiculares, reversibles tras una única exposición pero irreversibles tras dos semanas de exposición, 16 horas/día, 6 días/semana (De Martino y cols., 1987). Los signos de daño testicular fueron evidentes antes de que los animales desarrollasen síntomas neuropáticos. La neurotoxicidad se caracteriza clínicamente por debilidad de las patas traseras, que evoluciona hacia la parálisis. Las ratas expuestas a 500

ppm (1.790 mg/m³) de n-hexano (al 99%) durante 22 horas/día y 7 días/semana mostraron inflamación axonal en el nervio tibial tras dos meses, que evolucionó a degeneración pronunciada y pérdida de axones en los nervios tibial y ciático y en la médula lumbar tras seis meses de exposición (API, 1983). No se observó ningún efecto para un nivel de exposición de 125 ppm (448 mg/m³). Además de sus efectos sobre el sistema nervioso periférico (SNP), algunas publicaciones recientes han determinado que el n-hexano tiene efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) en animales de laboratorio (Pezzoli y cols., 1990). El mecanismo bioquímico de actuación del metabolito 2,5-hexanodiona es similar para el SNC y el SNP (Backstrom y cols., 1990, 1992).

1.5. EL CONTROL AMBIENTAL Y EL CONTROL BIOLÓGICO EN LA VALORACIÓN DE RIESGOS DE EXPOSICIÓN AMBIENTAL A DISOLVENTES

Para evaluar si la exposición a una sustancia química en el ámbito del trabajo implica riesgo para la salud, se deben comparar los datos que reflejan la exposición real y la permisible. En general se deben emplear dos sistemas complementarios: **el control ambiental y el control biológico** (Lauwerys, 1994).

Para las sustancias que penetran en el organismo por inhalación, se puede establecer una concentración admisible en el ambiente, es decir, una concentración que no constituye un riesgo para la salud de los trabajadores expuestos. El “**control ambiental de exposición**”, permite apreciar si las condiciones de trabajo son buenas y si los métodos de prevención son eficaces.

La presencia de contaminantes químicos en el medio ambiente de trabajo puede conducir a que éstos ejerzan su acción nociva sobre la salud de los trabajadores. La probabilidad de que esto ocurra, la intensidad o la extensión de los efectos adversos sobre la salud, dependerán, además de otros factores,

de la magnitud de la exposición, que a su vez es función de la concentración del contaminante en el ambiente y de la duración de la propia exposición.

Para preservar la salud de los trabajadores se deberá actuar eliminando la exposición si es posible, o reduciéndola de modo que se evite la aparición de efectos nocivos para la salud. Para la reducción y control de la exposición, será necesario por tanto, conocer o establecer unos niveles de concentración ambiental máximos permisibles y vigilar para que no se superen.

Ya que en los ambientes laborales la vía principal de entrada de los contaminantes, especialmente de los compuestos orgánicos volátiles, es la pulmonar, la cantidad de tóxico que entra al organismo está relacionada directamente con la abundancia del tóxico en el aire que se inhala. Por este motivo, inicialmente el control de la exposición se centró en la determinación de la concentración del tóxico en el ambiente. Sin embargo, más recientemente se está utilizando complementariamente el “**control biológico**”, el cual se basa en la medida de algún índice biológico que se modifica como consecuencia de la exposición.

La evaluación utilizando el control biológico de exposición, consiste en realizar análisis en el medio biológico de los sujetos expuestos (sangre, orina, aire espirado, etc.), con la finalidad de determinar la cantidad de sustancia tóxica absorbida o conocer los efectos relacionados con la dosis interna del tóxico. Este sistema está basado en los conocimientos sobre el metabolismo y el mecanismo de acción de las sustancias químicas. En este método se considera la absorción por otras vías, la respiratoria, la piel y el tracto digestivo, reflejando mucho mejor la exposición total y por lo tanto, el riesgo potencial.

La principal diferencia entre el control ambiental y el biológico es que, mientras el ambiental nos dará una idea de la **dosis externa recibida**, el biológico lo hará de la **cantidad absorbida por el organismo o dosis interna**. Necesariamente ambos tipos de control están íntimamente ligados como también lo están la dosis externa e interna. Ahora bien, el control ambiental proporciona sólo una estimación de la dosis recibida, porque lo que se

determina es la concentración en el aire y no la cantidad inhalada (ésta se puede deducir a partir del volumen que por término medio respira un individuo en la jornada laboral, pero sólo de forma aproximada); además la cantidad absorbida es también una fracción de la cantidad inhalada. El control biológico tiene una relación mucho más directa con la cantidad absorbida a través de distintas vías de penetración simultáneas ya que consiste en la estimación de la cantidad de contaminante absorbida a través de las distintas vías de entrada, mediante la determinación del mismo o de sus metabolitos específicos en fluidos biológicos, secreciones, excreciones, aire exhalado, o tejidos.

El objetivo primario del control ambiental y del control biológico es la estimación de la **“dosis a que está expuesto el individuo”** y el objetivo último de ambas técnicas es la valoración del riesgo para la salud del trabajador, lo que implica un pleno conocimiento de las relaciones exposición efecto/respuesta para el contaminante en cuestión (Lauwerys, 1994).

1.5.1. EL CONTROL AMBIENTAL

El análisis del aire ambiental es útil para determinar si la concentración ambiental de la sustancia a estudiar, es inferior a la considerada como aceptable de acuerdo con los conocimientos científicos actuales.

La evaluación de la exposición a contaminantes químicos se ha venido realizando tradicionalmente mediante el uso de criterios de valoración ambientales, es decir, determinando la concentración del xenobiótico, la sustancia extraña que entra al organismo, en aire, lo que junto con el tiempo durante el cual el trabajador se encuentra inhalando este aire, permite estimar la dosis externa recibida a lo largo de la jornada laboral. En este tipo de evaluación solo se tiene en cuenta la vía de entrada respiratoria.

Entre los valores límites más conocidos figuran las listas elaboradas en Estados Unidos de América por la ACGIH y que son conocidos como **valores TLV (Threshold Limit Value)**.

Así mismo, en Alemania la Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) edita también anualmente una lista de valores ambientales de referencia, los MAK (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration).

Los valores TLV hacen referencia a concentraciones de sustancias que se encuentran en suspensión en el aire. De igual manera, representan condiciones por debajo de las cuales se cree que casi todos los trabajadores pueden exponerse repetidamente, día tras día a la acción de tales concentraciones, sin sufrir efectos adversos para la salud. Sin embargo, dada la gran variabilidad en la susceptibilidad individual, es posible que un pequeño porcentaje de trabajadores experimenten malestar ante algunas sustancias a concentraciones iguales o inferiores al límite umbral, mientras que un porcentaje menor, puede resultar afectado más seriamente por la agravación de una condición que ya existía anteriormente o por la aparición de una enfermedad profesional.

Anualmente se publican en forma de "Propuestas de Modificación" las medidas que la Comisión de TLVs para las sustancias químicas, se propone tomar para cada año.

Los **TLVs** se clasifican en **tres categorías** según la ACGIH:

a) TLV-TWA (*Threshold Limit Value-Time Weighted Average*)
(Valor Límite Umbral-Media Ponderada en el Tiempo)

Son las concentraciones medias de sustancias químicas en el aire ambiental, tras una exposición repetida, 8 horas al día, 5 días por semana, durante toda una vida profesional y que no producen efectos nocivos en la mayoría de los trabajadores.

La concentración media admisible puede variar alrededor de una media, el grado de fluctuación tolerado depende de diversos factores, como la facilidad con que una intoxicación aguda aparece a concentraciones elevadas, los

efectos de acumulación de la sustancia analizada, el tipo de lesiones que se producen tras una concentración excesiva y de breve duración, etc.

La ACGIH ha recomendado que la fluctuación tolerable no sobrepase tres veces el valor de TLV-TWA durante más de 30 minutos en el curso de una jornada de trabajo; el factor de fluctuación no debe sobrepasar jamás 5 veces su valor. Es evidente que las fluctuaciones hacia arriba deben ser compensadas con fluctuaciones hacia abajo, de manera que el TLV debe ser respetado.

b) TLV-STEL (Threshold Limit Value-Short Term Exposure Limit)
(Valor Límite Umbral-Límite de Exposición de Corta Duración)

Es la concentración considerada en que los trabajadores pueden estar expuestos de manera continua, durante un corto tiempo sin sufrir irritación, daños crónicos o irreversibles en los tejidos o narcosis en grado suficiente para aumentar la probabilidad de lesiones accidentales, dificultad para salir por sí mismo de una situación de peligro o reducir la eficiencia en el trabajo y siempre que no sobrepase el TLV-TWA diario.

Se considera que una exposición de 15 minutos como máximo a estas concentraciones no implica una irritación intolerable, daños hísticos irreversibles o un estado de narcosis que pudiera favorecer los accidentes. No deben de tolerarse más de cuatro exposiciones por día a estas concentraciones y cada exposición debe espaciarse de la siguiente por lo menos en una hora.

Los STEL son concentraciones máximas y no medias o concentraciones admisibles para situaciones de urgencia. Se define, como la concentración media ponderada en un tiempo de 15 minutos, que no se debe de sobrepasar en ningún momento de la jornada laboral, aun cuando la media ponderada en el tiempo que corresponda a las ocho horas sea inferior al TLV. Las exposiciones por encima del TLV-TWA hasta el valor STEL no deben tener una duración superior a 15 minutos ni repetirse más de cuatro veces al día. Debe

haber por lo menos un período de 60 minutos entre exposiciones sucesivas de este rango. Se podría recomendar un período medio de exposición distinto de 15 minutos cuando lo justifiquen los efectos biológicos observados.

c) TLV-C (*Threshold Limit Value-Ceiling*) (*Valor Límite Umbral-Techo*)

Se define como la concentración que no se debe sobrepasar en ningún momento durante la exposición en el trabajo.

Para ciertas sustancias cuya acción tóxica es rápida se ha propuesto, no un valor medio, sino este valor máximo, que nunca debe ser sobrepasado (TLV-C: Threshold Limit Value-Ceiling o Valor Límite Techo, o MAC: Maximun Allowable Concentration o Concentración Máxima Permissible).

Los TLV han sido propuestos para un número limitado de sustancias cancerígenas, ya que es difícil definir una concentración umbral por debajo de la cual no exista riesgo.

Los TLV-TWA o las concentraciones máximas permisibles (TLV-C), sólo proporcionan indicaciones generales; es evidente que la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos de manera repetida al TLV de una sustancia sin presentar alteraciones de la salud. Sin embargo, es posible que esta concentración sea suficiente para causar una enfermedad profesional en sujetos hipersensibles o agravar la situación de estos individuos. Por lo tanto, respetar el TLV no elimina la necesidad de un examen periódico de los trabajadores. Estas normas científicamente fundadas, deben ser sólo directrices sujetas a revisión de acuerdo con el progreso de los conocimientos científicos.

Los datos que sirven de base a la elaboración de las concentraciones admisibles son:

- ✓ La experiencia anterior en la industria (encuestas epidemiológicas)
- ✓ El estudio en voluntarios

- ✓ Los estudios experimentales (in vivo e in vitro en animales)

La cantidad y naturaleza de la información disponible para el establecimiento de un valor TLV, varían de una sustancia a otra, por lo tanto, la exactitud del TLV estimado también está sujeta a variación.

Al igual que la ACGIH americana, también en España, a raíz la aprobación del RD 374/2001 de 6 de abril, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo, el INSHT elaboró un documento en el que se recogen los Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España, del cual se publican también ediciones anuales. En este documento se consideran como valores de referencia para la evaluación y control de los riesgos químicos las siguientes categorías de **Valores Límite ambientales o VLA:**

- ***VLA-ED (Valor Límite Ambiental-Exposición Diaria):***

Es el valor de referencia para la Exposición Diaria (ED) definida como la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador medida, o calculada de forma ponderada con respecto al tiempo para la jornada laboral real y referida a una jornada estándar de 8 horas diarias. Representan, al igual que los TLV-TWA, condiciones a las cuales se cree, basándose en los conocimientos actuales, que la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos 8 horas diarias y 40 semanales durante toda su vida laboral, sin sufrir efectos adversos para su salud.

- ***VLA-EC (Valor Límite Ambiental-Exposición de Corta Duración)***

Es el valor de referencia para la Exposición de Corta Duración (EC) definida como la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador medida, o calculada para cualquier período de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral, excepto para aquellos agentes químicos para los que se especifique un periodo de referencia inferior, en la lista de Valores Límite. El VLA-EC no debe ser superado por ninguna EC a lo largo de la jornada laboral.

A pesar de su indudable utilidad, la comparación de los análisis del aire ambiental en los puestos de trabajo con los TLV o VLA para apreciar si las condiciones de trabajo son saludables, sólo tienen interés, si los contaminantes analizados penetran en el organismo por vía pulmonar, que es la principal vía de entrada para la mayoría de tóxicos industriales. Si la vía cutánea es la vía de entrada predominante, entonces el análisis de aire ambiental no será un reflejo válido del grado de exposición. Se debe considerar, que para las sustancias que no penetran exclusivamente por vía pulmonar, es difícil obtener una estimación válida del grado de exposición de los trabajadores únicamente mediante el control ambiental.

Es claro que la concentración de una sustancia química en el ambiente de un taller no permanece constante ni en el tiempo ni en el espacio. Se puede salvar este inconveniente tomando muestras de aire de forma continua durante el trabajo o, aún mejor, registrando directamente de manera automática y continua la concentración atmosférica de la sustancia. Este procedimiento es técnicamente posible pero sólo nos da la concentración de la sustancia en un determinado lugar del local de trabajo.

Es bastante difícil determinar con exactitud el tiempo que un trabajador permanece en un lugar; si está durante todo el período de trabajo en un mismo puesto, quizá sea responsable de varias máquinas o procesos. También durante su jornada laboral puede ocupar puestos de trabajo distintos con diversos contaminantes. Suponiendo que haya una estimación continua de la concentración del tóxico en todos los puestos de trabajo, la estimación del grado de exposición de cada trabajador sería sólo aproximada, porque se debe de tener en cuenta el factor tiempo.

La cantidad de tóxico que penetra en el organismo está en función, no solamente de la concentración en el aire inhalado y del tiempo de exposición, sino también de los diferentes factores fisiológicos, especialmente de los parámetros respiratorios. La ventilación pulmonar no es constante en todos los individuos, ni tan siquiera en el mismo individuo, sino que va a depender de diferentes factores, como la actividad física. Por tal razón, aunque no varíe la

concentración del tóxico con el tiempo, la cantidad absorbida por el organismo puede variar. El método del control ambiental no tiene en cuenta la sensibilidad individual de los trabajadores. El mero análisis de las concentraciones de los contaminantes en el aire ambiental, no toma en consideración que haya personas que pueden verse afectada por concentraciones que se consideran tolerables para otros trabajadores.

Considerando las limitaciones del control ambiental para definir el grado de exposición, se han tratado de desarrollar pruebas biológicas que permitan precisar, para cada individuo expuesto, la cantidad total de sustancias tóxicas que ha absorbido.

1.5.1.1. Valores límite de exposición ambiental para tolueno, xileno y n-hexano

1.5.1.1.1. Tolueno. Valores límite de la exposición

En la tabla siguiente se presentan los valores límites umbrales de exposición profesional para tolueno, que se encuentran vigentes en la actualidad.

Tabla 5. Valores Límites Umbrales de Exposición Profesional para tolueno

VALOR LÍMITE AMBIENTAL	VALOR (ppm)	VALOR (mg/m³)
TLV-TWA (ACGIH) (vía dérmica)	50	192
TLV-STEL (ACGIH)	---	---
VLA-ED (España) (vía dérmica)	50	192
VLA-EC (España) (vía dérmica)	100	384

Fuente: INSHT, 2016; ACGIH, 2016

1.5.1.1.2. Xileno. Valores límites de exposición.

En la tabla siguiente se presentan los valores límites umbrales de exposición profesional para xileno, que se encuentran vigentes en la actualidad. Todos los isómeros presentan los mismos valores de TLV y VLA.

Tabla 6. Valores Límites Umbrales de Exposición Profesional para xileno

VALOR LÍMITE AMBIENTAL	VALOR (ppm)	VALOR (mg/m ³)
TLV-TWA (ACGIH)	100	441
TLV-STEL (ACGIH)	150	661
VLA-ED (España)	50	221
VLA-EC (España)	100	442

Fuente: INSHT, 2016; ACGIH, 2016

1.5.1.1.3. n-hexano. Valores límite de la exposición

En la tabla siguiente se presentan los valores límites umbrales de exposición profesional para xileno, que se encuentran vigentes en la actualidad.

Tabla 7. Valores Límites Umbrales de Exposición Profesional para n-hexano.

VALOR LÍMITE AMBIENTAL	VALOR (ppm)	VALOR (mg/m ³)
TLV-TWA (ACGIH) (vía dérmica)	50	176
TLV-STEL (ACGIH)	---	---
VLA-ED (España) (vía dérmica)	20	72
VLA-EC (España)	---	---

Fuente: INSHT, 2016; ACGIH, 2016

1.5.2. EL CONTROL BIOLÓGICO

Por muchos años la evaluación de la exposición profesional a sustancias químicas se basó principalmente en la medición de la concentración de estas sustancias en el ambiente de trabajo con la utilización de aparatos estáticos o de muestreo personal, esto es, en el control ambiental de la exposición. Ya se han mencionado en el apartado anterior, los inconvenientes y limitaciones de esta técnica. Los trabajadores no se pueden considerar un grupo homogéneo a la exposición de una sustancia de características fisicoquímicas bien definidas en condiciones estandarizadas y reproducibles, sino que se debe tener en cuenta la edad, sexo, talla, peso, aptitudes físicas, estado fisiológico y nutricional, etc. También, según la naturaleza de la actividad profesional y los hábitos higiénicos pueden verse expuestos a ciertas sustancias no sólo por inhalación sino también por vía oral y cutánea.

Por otra parte, para una concentración determinada de una sustancia en el ambiente hay diferencias marcadas entre los individuos, en cuanto a absorción, biotransformación, distribución y excreción, lo que puede dar lugar a variaciones en la cantidad de metabolito activo que llega al lugar o lugares de acción. La determinación por el método biológico de la cantidad de sustancia absorbida (dosis interna) o de su fracción metabólicamente activa, o ya fijada en los lugares de acción, permite valorar algunos de estos factores individuales.

Así, el **control biológico de exposición** fue definido por Lauwerys (1985), como "la evaluación indirecta de la exposición de un trabajador a agentes nocivos, mediante la medición en un medio biológico adecuado de las concentraciones del agente como tal, de su(s) metabolito(s) o de los fenómenos que reflejan las modificaciones resultantes de la absorción del tóxico". Es decir, el control biológico de la exposición es la medida y valoración de los agentes químicos, o de sus metabolitos, o de cambios bioquímicos originados por ellos en fluidos biológicos, secreciones, excreciones, aire exhalado, o tejidos, para evaluar la exposición y el riesgo para la salud del trabajador mediante su comparación con valores de referencia adecuados

(Berlin y cols., 1982). Esta valoración del riesgo, basada en criterios biológicos, nos permite determinar la dosis interna recibida con independencia de la vía de entrada del xenobiótico.

El control biológico, es un método en el que se evalúa el riesgo para la salud de los sujetos expuestos a un producto químico basándose en la determinación de la exposición en el interior del organismo. Se trata pues, de una estimación individual de la cantidad de sustancia efectivamente absorbida (dosis interna).

Existe una estrecha relación entre el control ambiental y el biológico, basada en la relación entre exposición externa (también llamada dosis externa) y la dosis interna. Las dos formas de control tienen como fin la prevención de efectos sobre la salud.

La dosis interna se obtiene midiendo la sustancia o sus metabolitos en los medios biológicos, generalmente orina, sangre o aire exhalado tomados al trabajador, o midiendo los efectos biológicos no tóxicos relacionados con la dosis interna. Para las sustancias que penetran en el organismo y ejercen sus efectos tóxicos, la vigilancia biológica proporciona una mejor evaluación del riesgo para la salud que la vigilancia del ambiente. El control biológico tiene la ventaja de abarcar todas las fuentes de exposición; si hay exposiciones no profesionales que se añaden a exposiciones profesionales, afectarán al resultado de la vigilancia biológica. De esta manera se eliminan parte de los problemas que planteaba la utilización exclusiva del control ambiental.

De la misma manera que los TLV americanos o MAK alemanes para el control ambiental, la ACGIH y la DFG han adoptado una serie de Índices Biológicos de Exposición (BEIs) y Valores Biológicos de Tolerancia (BATs), respectivamente, que son valores de referencia propuestos como guía para la evaluación del riesgo potencial para la salud en la práctica de la Higiene Industrial. Representan los niveles de los determinantes que son más probables de observar en especímenes tomados en trabajadores sanos, que han estado sometidos a una exposición por inhalación de un compuesto químico de concentración igual al TLV o MAK.

El **valor límite biológico** se define como el límite de la concentración, en el medio biológico adecuado, del agente químico o de uno de sus metabolitos, o de otro indicador biológico directo o indirectamente relacionado con los efectos de la exposición del trabajador al agente en cuestión.

El establecimiento de valores de referencia biológicos está mucho más condicionado a los avances científicos que el de los valores ambientales, puesto que, cuando se supone que un determinado indicador biológico es adecuado para el control de la exposición a un agente, deben determinarse los valores de referencia adecuados para su correcta utilización. Se han publicado numerosos trabajos relacionados con propuestas de adopción de valores límite biológicos, muchos de ellos basados en la aplicación de modelos farmacocinéticos-fisiológicos (Fiserova-Bergerova V, 1990; Leung H, 1992) y la mayoría basados en numerosos estudios experimentales realizados con voluntarios o en población laboralmente expuesta (Ikeda y cols., 1978; Prado y cols., 1997; Perbellini y cols., 1990; Kawai y cols., 1992).

Los **BEIs** son valores de referencia para la evaluación de los riesgos potenciales para la salud y representan los niveles de los determinantes biológicos que se corresponden con los determinados en especímenes biológicos de trabajadores, expuestos por vía inhalatoria a una concentración ambiental del contaminante equivalente a su valor límite ambiental (TLV). Los BEIs se proponen como guía para la evaluación del riesgo potencial para la salud en la práctica de la higiene industrial, generado por exposiciones de 8 horas durante 5 días a la semana.

Un BEI no establece una distinción entre una exposición segura y otra peligrosa para la salud, ya que, debido a las variaciones biológicas interindividuales, una medición individualizada de un parámetro biológico puede exceder el BEI sin que ello suponga necesariamente que exista un riesgo para la salud. Tampoco están propuestos para usarlos como medida de los efectos adversos o para el diagnóstico de enfermedades profesionales. Sin embargo, si las determinaciones biológicas efectuadas repetidamente en un mismo individuo superan el BEI, o si lo supera la mayoría de las determinaciones

biológicas de un grupo de trabajadores expuestos al mismo ambiente laboral, se deben adoptar las medidas necesarias para reducir la exposición.

Los **BATs** se definen como la máxima cantidad permisible de compuesto químico, sus metabolitos o cualquier desviación de los parámetros biológicos normales inducida por una sustancia en personas expuestas. Se establecen en base a los datos científicos que permiten asegurar que esas concentraciones no tienen efectos adversos para la salud de los trabajadores. Al igual que los límites ambientales, se establecen bajo la suposición de que las personas están expuestas 8 horas diarias y 40 horas semanales. Estos valores se definen en términos de concentración o velocidad de formación o excreción (cantidad por unidad de tiempo) y se conciben como valores “techo” para la salud, habiéndose tomado en consideración los efectos de las sustancias químicas y un adecuado margen de seguridad. Su utilización sólo es posible para aquellos agentes que pueden penetrar en el organismo por las vías inhalatoria o dérmica. Los datos tenidos en cuenta para su establecimiento, deben apoyarse en observaciones sobre humanos, requiriéndose una experiencia suficiente con el compuesto en materia de salud laboral y toxicología. Los valores BAT proporcionan la base para un juicio del potencial tóxico o seguridad de las cantidades de agentes químicos absorbidos por el organismo en el lugar de trabajo.

Dado que la distribución y eliminación de un compuesto químico o sus metabolitos y los cambios bioquímicos inducidos por la exposición a los agentes químicos son sucesos cinéticos, se ha establecido un momento de muestreo que indica cuándo debe tomarse la muestra respecto a la exposición, siendo aplicables los BEIs solamente si la toma de la muestra biológica se realiza en el momento especificado.

La base de datos para la recomendación de un BEI se toma de la información disponible sobre la absorción, metabolismo y eliminación de los compuestos químicos y de la correlación entre la intensidad de exposición y el efecto biológico en los trabajadores. El BEI está basado, bien en la relación entre la intensidad de la exposición y los niveles biológicos del determinante, o bien en

la relación entre los niveles biológicos del determinante y efectos en la salud. Para encontrar estas relaciones se utilizan los datos de exposiciones controladas en humanos o estudios realizados en los puestos de trabajo, no considerándose adecuados los estudios en animales.

El INSHT propone también valores límites biológicos para determinados compuestos químicos. En este caso se designan como **VLB** (Valor límite biológico) y coinciden con la definición de los BEIs (valores de referencia para los indicadores biológicos asociados a la exposición global a los agentes químicos y aplicables a exposiciones profesionales de 8 horas diarias durante 5 días a la semana).

La extensión de los VLB a periodos distintos al de referencia, ha de hacerse considerando los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos del agente en particular. En general, los VLB representan los niveles más probables de los indicadores biológicos en trabajadores sanos sometidos a una exposición global a agentes químicos equivalente, en términos de dosis absorbida, a una exposición exclusivamente por inhalación del orden del VLA-ED. La excepción a esta regla la constituyen algunos agentes para los que los VLA asignados protegen contra efectos no sistémicos. En estos casos, los VLB pueden representar dosis absorbidas superiores a las que se derivarían de una exposición por inhalación al VLA.

El documento del INSHT establece, respecto al control biológico, que debe considerarse complementario al control ambiental y, por tanto, ha de llevarse a cabo cuando ofrezca ventajas sobre el uso independiente de este último. Además menciona que el control biológico puede usarse para completar la valoración ambiental, para comprobar la eficacia de los equipos de protección individual o para detectar una posible absorción dérmica y/o gastrointestinal.

Sintetizando lo señalado en relación a los dos métodos de valoración de la exposición laboral a que hacemos referencia, podemos concluir que, a pesar de la indudable utilidad del control ambiental, éste presenta problemas de representatividad en casos de gran movilidad del operario entre áreas de

trabajo distintas, lo cual conlleva a variaciones de concentración en el tiempo y en el espacio, además de que no tienen en cuenta la participación de otras vías de entrada además de la respiratoria. De estas limitaciones surge, como complemento al control ambiental, el control biológico de exposición que es una valoración de la exposición total a los compuestos químicos que están presentes en el puesto de trabajo, a través de medidas apropiadas de un determinante en fluidos biológicos tomados del trabajador a un tiempo determinado. De acuerdo a la definición de Lauwerys, el determinante analizado puede ser el mismo compuesto químico o sus metabolitos (indicador de dosis), o un efecto bioquímico o fisiológico inducido por la absorción de dicho compuesto químico (indicador de efecto). La medida suele realizarse en el aire exhalado, la orina o la sangre (Lauwerys, 1994).

Estos valores límite biológicos (BEIs, BATs o VLBs) están basados en estudios que han tratado de establecer una correlación entre las concentraciones de disolventes en el ambiente industrial, y aquellos parámetros en medios biológicos (aire exhalado, sangre, orina) que reflejan la impregnación debido a ellos.

Como se puede apreciar, existen dos tipos de control biológico diferentes y que a menudo se confunden: el control biológico de la exposición y el control biológico de efectos o vigilancia de la salud. Ambas técnicas preventivas se distinguen claramente por sus objetivos. Con la primera se pretende efectuar una prevención primaria por la que el individuo no llegue a presentar nunca alteraciones de salud. Mediante la segunda, se pretende descubrir la presencia de alteraciones precoces de la salud del trabajador, evitando con ello que se produzca su progresivo deterioro (Obiols, 1998).

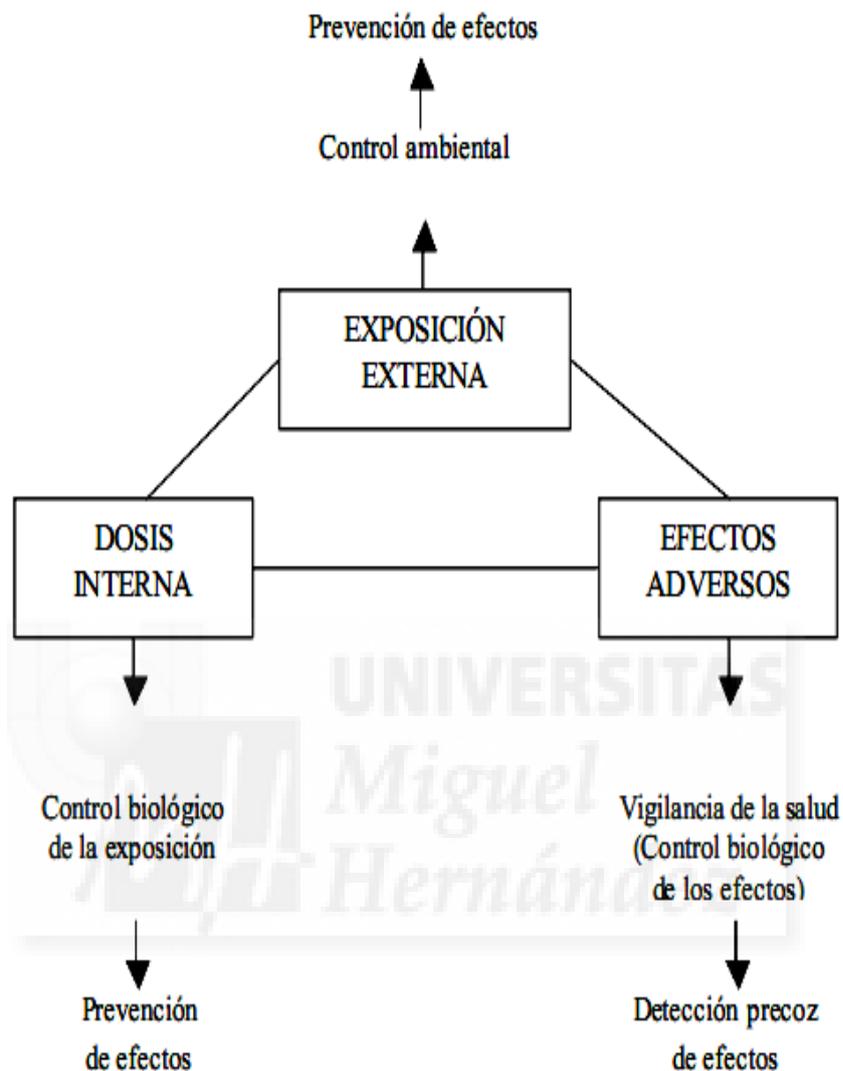


Figura 12. Relaciones entre exposición ambiental y efectos adversos sobre la salud.
Fuente: Obiols, 2001

El control biológico puede ser especialmente útil en las siguientes situaciones (Obiols, 1998).

- ✓ Exposición a compuestos escasamente volátiles y que, por tanto, difícilmente van a encontrarse en concentraciones elevadas en el aire y será poco probable que sean absorbidos por vía inhalatoria, pero que pueden ser absorbidos a través de la piel.

- ✓ Manipulación de disolventes muy volátiles y, por tanto, fácilmente absorbibles por vía inhalatoria, y que además pueden penetrar a través de la piel de quien los manipula.
- ✓ Evaluación de la exposición a un agente químico debida a prácticas o hábitos de trabajo inadecuados, aun cuando los niveles ambientales del mismo sean aceptables.
- ✓ Situaciones en las que los controles de aire ambiental sean difícilmente realizables en razón del propio puesto de trabajo, como es el caso de ciclos muy irregulares, o con desplazamientos constantes del trabajador de una zona a otra, o simplemente variaciones muy notables de la concentración ambiental en espacios de tiempo muy cortos.
- ✓ Cuando se requiera comprobar la eficacia de un sistema de protección personal frente a la presencia de un agente en el aire del lugar de trabajo.
- ✓ Situaciones en las que las mediciones ambientales no pueden reflejar la exposición interna del trabajador por alguna circunstancia especial, por ejemplo, un esfuerzo físico superior a lo normal.

1.5.2.1. Valores límites biológicos para tolueno, xileno y n-hexano

1.5.2.1.1. Tolueno. VLB'S

En la tabla siguiente se presentan los valores límites biológicos para tolueno, vigentes en la actualidad.

Tabla 13 Valores Límites Biológicos (VLB's y BEI's) para tolueno

DETERMINANTE	MOMENTO DEL MUESTREO	VALOR
O- Cresol (en orina)	Final de la jornada laboral	0,5 mg/l (VLB)
		0,3 mg/l (BEI)
Ácido HIPURICO (en orina)	Final de la jornada laboral	1,6 g/g de creatinina (VLB)

Tolueno (en sangre)	Principio de la última jornada de la semana laboral	0,05 mg/l (VLB)
		0,02 mg/l (BEI)
Tolueno (en orina)	Final de la jornada laboral	0,08 mg/l (VLB)
		0,03 mg/l (BEI)

Fuente: INSHT, 2016; ACGIH, 2012

Como se puede apreciar en la tabla anterior, los valores límite biológicos para el tolueno, se basan en la medida de los metabolitos en orina, pero también se proponen mediciones de tolueno en sangre y orina.

1.5.1.2.2. Xileno. VLB'S

En la tabla siguiente se presentan los valores límites biológicos para xileno, vigentes en la actualidad

Tabla 14. Valores Límites Biológicos (VLB's y BEI's) para xileno

DETERMINANTE	MOMENTO DEL MUESTREO	VALOR
Ácidos metil Hipúricos (en orina)	Final de la jornada laboral	1 g/g de creatinina (VLB)
		1,5 g/g de creatinina (BEI)

Fuente: INSHT, 2016; ACGIH, 2012

Para el xileno, solo se proponen los VLB de los metabolitos principales en orina.

1.5.1.2.3. n-hexano. VLB'S

En la tabla siguiente se presentan los valores límites biológicos para n-hexano, vigentes en la actualidad

Tabla 15. Valores Límites Biológicos (VLB) para n-hexano

DETERMINANTE	MOMENTO DEL MUESTREO	VALOR
2,5-Hexanodiona (en orina)	Final de la semana laboral	0,2 mg/l (sin hidrólisis) (VLB)
		0,4 mg/l (BEI)

Fuente: INSHT, 2016; ACGIH, 2012

En el caso del n-hexano, se propone únicamente la medición del metabolito libre en orina sin hidrólisis, es decir, sin conjugar.

1.5.2.2. Ventajas y limitaciones del control biológico

El control biológico de la exposición laboral a VOC's proporciona una evaluación del riesgo para la salud más ajustada que el control ambiental, ya que un parámetro biológico que refleje la dosis interna, está necesariamente más relacionado con los efectos biológicos tóxicos, que una medición de la concentración ambiental. Además, presenta la ventaja de integrar todas las vías de entrada: respiratoria, digestiva y percutánea, permitiendo en ciertos casos estimar la posible contribución de cada una de ellas a la dosis interna (Waritz, 1985).

El control biológico también permite valorar el riesgo global generado por la exposición, porque reflejará otras posibles exposiciones distintas a las de orígenes laborales debidos al lugar de residencia, actividades de ocio, hábitos alimenticios, etc., que pueden constituir una exposición de fondo que incremente o potencie la estrictamente laboral. Así mismo, pone de manifiesto aspectos concretos de la exposición, como variaciones individuales en la velocidad de absorción de un compuesto químico, el efecto de la carga de trabajo del individuo expuesto, o el tamaño y solubilidad de las partículas del agente contaminante.

Finalmente, la principal ventaja del control biológico, es que posibilita el control individual de la exposición a la que se encuentra sometido el trabajador.

Por el contrario, como ya se ha comentado, los resultados del control biológico estarán sometidos a variabilidad debida a consumo de alcohol, fármacos, etc., aún bajo las mismas concentraciones de disolventes en ambiente. Igualmente, debemos tener en cuenta la coexposición entre diversos agentes químicos, tolueno y xileno o hexano con estireno, que habitualmente pueden ocurrir en los puestos de trabajo donde se utilicen estos disolventes.

Además, los resultados del control biológico estarán sometidos a las diferencias intraindividuales e interindividuales que tienen lugar en las concentraciones de los determinantes elegidos, aún en las mismas condiciones

de exposición. La respuesta del ser humano a un mismo nivel de exposición a un agente químico varía ampliamente. De hecho, en los últimos años, han sido demostradas variaciones en las actividades de las enzimas responsables de la biotransformación de tóxicos, lo que evidentemente conduce a una diferente producción y excreción de metabolitos. Con respecto a esto, se conoce que muchos de los genes que codifican enzimas de metabolismo presentan carácter polimórfico, encontrándose alguno de estos polimorfismos ligados a cambios en la función o actividad catalítica de la proteína codificada y por tanto en la capacidad individual de biotransformación de tóxicos.

Adicionalmente, la mayoría de los compuestos químicos, adquieren su potencial carcinogénico y genotóxico tras una activación de índole enzimática, siendo necesario la caracterización y el estudio del funcionamiento de las principales enzimas implicadas en el metabolismo así como la evaluación del efecto citogenético mediante la utilización de un test fiable.

Por todo ello, se considera que la estimación del riesgo asociado a la exposición a un agente genotóxico ha de ser evaluada teniendo en cuenta las características genotípicas de sus enzimas, ya que éstas pueden determinar la susceptibilidad individual a ese agente en concreto.

1.6. TÉCNICAS DE ESTUDIOS TOXICOGENÉTICOS.

La Toxicología Genética trata de proporcionar información esencial para el mantenimiento de la integridad del material genético a fin de prevenir o ralentizar la carcinogénesis, el desarrollo de enfermedades hereditarias o el envejecimiento (Kramer, 1998). Para ello estudia la genotoxicidad, que consiste en la caracterización y descripción de la acción de aquellos agentes que, a nivel subtóxico, provocan algún tipo de modificación en el material genético (Brusick, 1987). La acción de los agentes genotóxicos puede dar lugar a la inducción de cambios en la secuencia de DNA provocando la aparición de mutaciones puntuales, o más a gran escala, de aberraciones cromosómicas

visibles. Las modificaciones en la cadena polinucleotídica a menudo producen la alteración o eliminación de la función génica.

Los ensayos de genotoxicidad están diseñados para detectar compuestos que inducen de manera directa o indirecta daño en el material genético por diferentes mecanismos, siendo un requisito fundamental la evaluación mutagénica para la caracterización toxicológica de un producto químico. El estudio de las mutaciones genéticas se lleva a cabo mediante diferentes ensayos in vitro e in vivo, de complejidad variable, según el mecanismo biológico que vayamos a analizar.

En la actualidad, no existe un único test de mutagenesis capaz de detectar por sí solo todo tipo de mutación. Estos tests utilizan o miden biomarcadores. Se distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o efecto) que miden alteraciones en alguno de los procesos implicados en el mantenimiento de la integridad del genoma (síntesis, reparación, replicación, división).

Los tests que pertenecen al grupo de los biomarcadores de efecto, son indicadores del daño causado por la exposición a xenobióticos. Son generalmente indicadores preclínicos de anomalías y los más frecuentemente usados en la evaluación son: el intercambio de cromátidas hermanas (SCEs), las aberraciones cromosómicas (CAs) y los micronúcleos (MN). Recientemente, el uso del gel de electroforesis de una sola célula de ensayo (SGCE) o el ensayo del cometa, se han propuesto como biomarcadores de efecto temprano (Rueff y cols., 2009)

1.6.1 ANÁLISIS PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR es una técnica válida para diferentes aplicaciones médicas o investigadoras, que requieran una concentración alta de un fragmento concreto del ADN como por ejemplo, para identificar anomalías en la secuencia de nucleótidos asociados o causantes de posibles patologías posibles

patologías. La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como **PCR** por sus siglas en inglés, **Polymerase Chain Reaction**) permite amplificar más de un millón de veces un fragmento de DNA obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico a alta temperatura (> 90 °C), y seguido por otro al final del proceso para la extensión de producto final. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de una gran variedad de parámetros. Estos incluyen la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y de la concentración de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores (secuencias cortas de entre 6 y 40 nucleótidos que permiten que la polimerasa inicie la reacción), así como la longitud del fragmento de DNA que se desea amplificar.

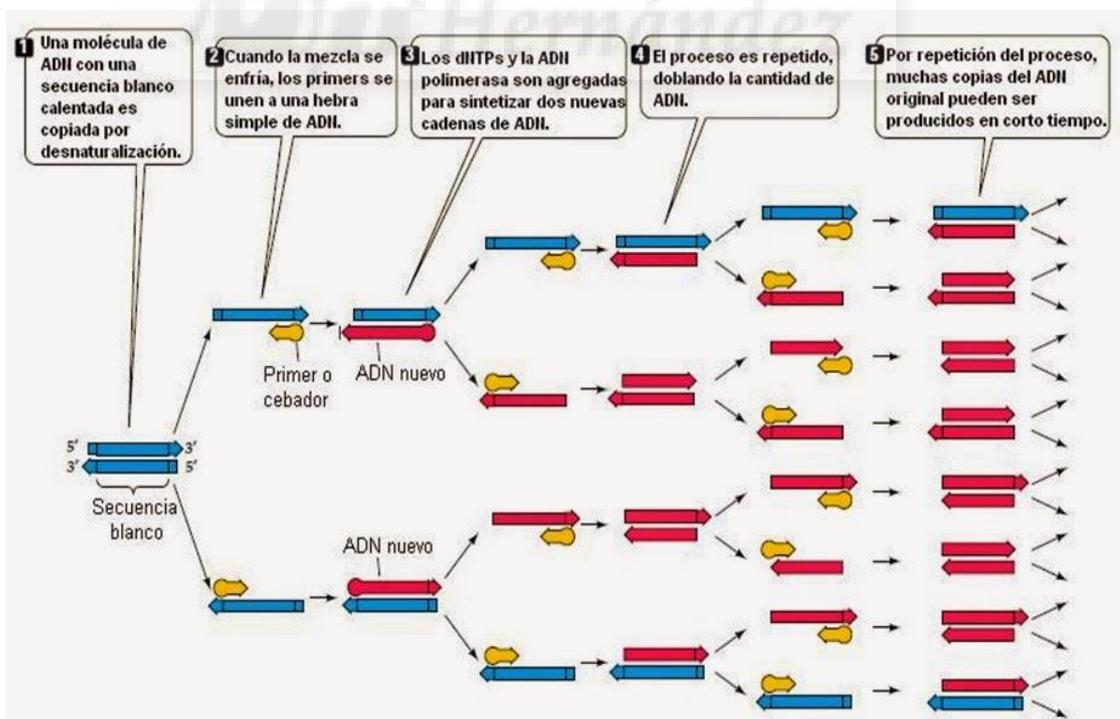


Figura 13. Técnica de la PCR. Fuente: Rennenberg, 2008

Para nuestro estudio, hemos utilizado dos tipos diferentes de PCR, denominados RT-PCR y RFLP- PCR:

- **PCR con transcriptasa inversa/reversa (RT-PCR)**

Es una variante de la PCR en la que usamos mRNA como molde inicial en vez de DNA, y emplea una transcriptasa inversa para realizar la síntesis de un DNA complementario al RNA. La amplificación exponencial mediante PCR en transcripción reversa supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de RNA muy bajo. Los principales usos de la RT-PCR están relacionados con el campo del diagnóstico molecular y con la investigación científica. Puede utilizarse como método de cuantificación y es el método de elección cuando se quieren establecer con precisión los niveles de expresión génica.

- **RFLP - PCR**

Reacción de PCR en donde el DNA purificado puede ser amplificado usando la PCR y luego tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de DNA de diferentes longitudes. Estas enzimas de restricción realizan un proceso de digestión restrictiva en el cual reconocen cortas secuencias cortas específicas en el DNA amplificado, generando cortes o no, según la existencia de secuencias definidas dando lugar a la formación de fragmentos de distintas longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa a través del cual corren debido a un campo eléctrico y su disociación obedece a la masa o a la carga eléctrica de las muestras según la técnica utilizada. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un DNA en particular debido a la diferencia en las secuencias del DNA en los individuos donde los sitios de restricción varían. Por tanto, se trata de una técnica que nos permite distinguir individuos homocigotos de aquellos heterocigotos, es decir, nos permite observar cada uno de los alelos que estudiamos. En algunos casos, se puede transferir e inmovilizar las bandas del gel en membranas y detectar el polimorfismo mediante hibridación del DNA en la membrana con sondas marcadas.

1.6.2 TÉCNICA DEL ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA (CBMN)

El ensayo de micronúcleos está considerado como un ensayo práctico universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes neurotóxicos. (Zalacain y cols., 2005).

Los micronúcleos son fragmentos o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante la mitosis; mediante su estudio se pueden evaluar los efectos de genotóxicos ambientales y ocupacionales. Esta prueba es ampliamente utilizada y es una alternativa eficaz, sencilla y económica para detectar la pérdida de material genético (Torres-Bugarin y Ramos-Ibarra, 2013)

El estudio de micronúcleos (MN) se encuadra dentro de los marcadores de efecto biológico precoz, aquellos que reflejan la presencia de un efecto biológico irreversible como resultado de un efecto tóxico. Esta técnica tras su estandarización, es capaz de detectar un daño genotóxico aunque el efecto sea muy bajo. Se basa en la hipótesis de que, cualquier anomalía cromosómica inestable, se desechará de la célula en forma de micronúcleo. Pero además, con la posibilidad de aplicar la tecnología de FISH (técnicas de hibridación in situ con fluorescencia) a los micronúcleos, se pueden diferenciar dos tipos: el micronúcleo formado por un trozo acéntrico de cromosoma, desecho de aberraciones cromosómicas inestables, con un significado de daño genotóxico y el micronúcleo que contiene un cromosoma entero y que inducido por agentes aneugénicos, puede tener un significado bien distinto; la no disyunción o la aneuploidía cromosómica que también se puede traducir en cáncer. (Fenech y Bonassi, 2011).

1.7. JUSTIFICACIÓN

Muchos estudios han tratado de evaluar los riesgos por inhalación de vapores de disolventes en personal expuesto laboralmente, mediante la determinación de concentraciones ambientales de estos disolventes y los análisis de marcadores biológicos que puedan ser útiles para la prevención del desarrollo de la enfermedad profesional. Así, como se ha comentado anteriormente, se utilizan como control biológico de trabajadores expuestos a n-hexano el análisis de la concentración del metabolito 2,5-hexanodiona (2,5-HD), el control biológico de la exposición al tolueno se realiza rutinariamente mediante la determinación de la concentración de ácido hipúrico (HA) en orina. La exposición a los xilenos se realiza determinando los metabolitos orto, meta y para-metilhipúricos (mHPA) en orina. Para todos estos disolventes utilizados en la fabricación del calzado, organismos como la ACGIH y el INSHT, han establecido valores límite de exposición para su utilización en la Higiene Industrial.

En la bibliografía publicada existen muchos estudios realizados en personal trabajadores de empresas de calzado que están rutinariamente expuestos a mezclas complejas de disolventes que incluyen acetona, n-hexano, tolueno y xileno (Pitarque y cols., 1999; Uuksulainen y cols., 2002). Ninguno de estos disolventes está considerado genotóxico o carcinogénico per se (Agency for toxic substances and disease registry, 2002; EPA, 2003). Sin embargo los efectos sobre la salud de las mezclas de estos disolventes no son bien conocidos, pero el elevado riesgo ha sido considerado como una consecuencia de la exposición a estas mezclas complejas (Uuksulainen y cols., 2002). Mientras que la neurotoxicidad del tolueno es un factor aceptado, su genotoxicidad en mezclas complejas esta todavía discutiéndose; tal vez sus efectos se lleven a cabo aumentando la susceptibilidad del huésped a carcinógenos y / o favoreciendo la mayor biodisponibilidad de otros productos genotóxicos (Pitarque y cols., 1999, 2002; Nakajima y Wang, 1994)

Se han demostrado variaciones entre los diferentes individuos que difieren significativamente en sus capacidades de biotransformación de tóxicos. Esto

nos indica que la producción y excreción de metabolitos será diferente, y estas diferencias están relacionadas con las enzimas de metabolización y biotransformación de tóxicos. Concretamente se han encontrado en humanos considerables diferencias interindividuales en la actividad enzimática del citocromo P450 (Shimada y cols., 1994), cuyos efectos in vivo se traducen en diferentes sensibilidades a los tóxicos químicos y con un potencial de riesgo de toxicidad característico al perfil enzimático del individuo. Debido al particular epicentro de sustancias sobre las que actúa, la isoforma del citocromo P450 denominada CYP2E1 es de gran interés para la medicina ocupacional y medioambiental. El enzima CYP2E1 presenta polimorfismo en humanos y los distintos genotipos, podrían al menos en parte, estar relacionados con los diferentes niveles individuales de la expresión de la actividad enzimática (Garte y cols., 2001; Thier y Bolt, 2001)

Otras enzimas destacables por su importancia en los procesos de biotransformación son las pertenecientes a la familia de las Glutathion S-transferasas (GST), consideradas como parte de la defensa celular contra numerosas sustancias químicas (Autrup, 1999). Dentro de esta familia se han encontrado tres principales genes polimórficos (GSTP1, GSTM1, y GSTT1) que dan lugar a alteraciones en la actividad catalítica de las enzimas para las que codifican.

El estudio que hemos realizado está enfocado a profundizar en el análisis de los factores de riesgo tóxico de los disolventes tolueno, xileno y n-hexano, mediante control higiénico-clínico, ambiental y biológico de los trabajadores expuestos a estos disolventes, y principalmente a evaluar la posible utilización de biomarcadores de susceptibilidad genética y de efecto genotóxico en la valoración del riesgo individual. El estudio pretende el desarrollo de técnicas de detección precoz de alteraciones, a nivel de sensibilidad al tóxico y del efecto biológico en estadio subclínico, que puedan ser incluidas en los protocolos de salud laboral como estrategia preventiva, evitando la aparición de daños irreversibles.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2.1. HIPÓTESIS

Tomando como base la situación actual del conocimiento en relación al estudio de los factores de riesgo tóxico a los disolventes tolueno, xileno y n-hexano y dado que:

1. Existe una relación entre factores ocupacionales (años de exposición, multiexposición a disolventes, condiciones de trabajo, normas higiénicas seguidas por los trabajadores) y extraocupacionales (hábitos tóxicos, características biológicas individuales) y los niveles de los indicadores biológicos de exposición habitualmente utilizados (metabolitos en orina).
2. Los polimorfismos genéticos en las enzimas de metabolización: CYP2E1 y GSTs (GSTM1, GSTT1 y GSTP1), pueden alterar la expresión fenotípica y los niveles de los metabolitos finales del proceso de biotransformación.
3. Que se han descrito efectos citogenéticos en individuos expuestos a disolventes.

La existencia de una posible correlación entre los 4 factores (indicadores biológicos, polimorfismos, fenotipo y efecto citogenético) serviría como marcador extremadamente fiable del efecto/riesgo en el desarrollo de enfermedades y tumores en individuos laboralmente expuestos, pudiendo explicar, a su vez, el comportamiento de los indicadores habituales utilizados en el control biológico

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del trabajo es estudiar la utilidad del análisis de genotipos y fenotipos en enzimas responsables de la metabolización de tóxicos: Isoformas

en los genes CYP2E1 de activación y GSTM1, GSTT1 y GSTP1 de detoxificación, como herramienta que permita la evaluación y la estratificación de niveles de riesgo laboral por exposición a disolventes (n-hexano, tolueno, xilenos, cetonas, etc), en trabajadores del calzado; correlacionar los datos obtenidos con los indicadores biológicos habitualmente utilizados en los programas de vigilancia de la Salud Laboral y así, poder disponer de herramientas que permitan establecer nuevos protocolos de prevención de daños irreversibles en la salud de los trabajadores.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valoración de los niveles ambientales de los disolventes orgánicos que existen en cada puesto de trabajo y de las condiciones seguridad e higiene de los trabajadores de diversas empresas de fabricación de calzado de la provincia de Alicante.
- Cuantificación de los indicadores biológicos habitualmente utilizados en el control biológico, en la orina de los trabajadores expuestos.
- Análisis de los polimorfismos más comunes de la CYP2E1, de las GSTs (GSTM1, GSTT1 y GSTP1) en las muestras de mucosa bucal recogidas a los trabajadores mediante frotis de mejilla, utilizando la técnica RFLP-PCR.
- Estudio de la expresión fenotípica de estas enzimas a partir de las muestras de sangre recogidas a los trabajadores, mediante la cuantificación del mRNA específico por RT-PCR.
- Determinación del posible efecto citogenético mediante el test de micronúcleos en muestras de sangre.

- Relación entre los disolventes en ambiente y los respectivos indicadores biológicos y valoración de la influencia de factores ocupacionales y extraocupacionales en los niveles de estos indicadores.
- Estudio de las relaciones de los polimorfismos de los enzimas estudiados y de su expresión fenotípica con el posible efecto citogenético, así como con los niveles de los indicadores estudiados y las variables laborales.



3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN Y PLAN DE TRABAJO

Se realizó un estudio observacional trasversal sobre una muestra de trabajadores expuestos a disolventes orgánicos en sus puestos de trabajo y sobre otra muestra de trabajadores no expuestos que se utilizó como grupo control

En primer lugar, se llevó a cabo la selección de empresas y trabajadores, tanto expuestos a disolventes (trabajadores de empresas del sector del calzado) como no expuestos (controles, sin relación laboral con disolventes orgánicos). Se elaboró la información sobre el estudio para la solicitud de participación en el mismo (anexo I para individuos expuestos y anexo IV para los controles).

Dentro del protocolo de los exámenes de vigilancia de la salud que se realizan a los dos grupos de trabajadores de forma periódica por el Servicio de Prevención correspondiente, se les informó del objetivo del estudio y se les solicitó autorización para la toma de muestras de sangre, de orina y de mucosa bucal mediante la firma de documento de consentimiento informado (anexos II y V, para expuestos y controles respectivamente). Se les pasó una encuesta en la que se recogen aspectos médico-clínicos (anexos III y VI) y se realizaron análisis clínicos en sangre y orina para determinar el estado de salud general y la pertinencia en el estudio. Se tomaron muestras de mucosa bucal y sangre para el análisis del genotipado y fenotipado de las enzimas incluidas en el estudio (análisis de polimorfismos mediante RFLP-PCR a partir de muestras de mucosa bucal y cuantificación de mRNA mediante RT-PCR en muestras de sangre) y para la determinación del posible efecto citogenético mediante el test de los micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.

En el grupo de expuestos, se llevó a cabo una valoración higiénica de los puestos de trabajo mediante visita a la empresa en jornada de trabajo. Así mismo, se tomaron muestras ambientales para determinar los niveles de los disolventes a los que se encuentran expuestos los trabajadores en su jornada de trabajo. Se solicitó a los trabajadores expuestos, que procurasen no orinar durante al menos las tres últimas horas del turno laboral y una vez finalizado

éste, se recogieron muestras de orina para la determinación de los respectivos indicadores biológicos. Los datos experimentales obtenidos se informatizaron y codificaron para su tratamiento estadístico valorando la influencia de los diferentes factores ocupacionales y extraocupacionales en los niveles de los indicadores y estudiando las relaciones de los polimorfismos de las enzimas estudiadas y sus niveles de expresión en sangre con los indicadores biológicos y el posible efecto citogenético.

3.1.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La **selección de los trabajadores** se realizó acudiendo a empresas de este sector que están siendo controladas por servicios de prevención que colaboran con la Universidad Miguel Hernández. El establecimiento del grupo de expuestos y la categorización de la exposición se realizó en base al plan de prevención de cada empresa muestreada, donde vienen definidos los puestos de exposición. En la siguiente tabla se describe el número de trabajadores que corresponden a cada empresa y el porcentaje de cada empresa sobre el total de la muestra (tabla 16).

Tabla 16. Distribución de trabajadores por empresas y porcentaje sobre el total.

EMPRESA	Frecuencia	Porcentaje
BEL	11	6,6
ELP	4	9,0
GUF	9	14,4
HOD	9	19,8
INSO	8	24,6
KECK	3	26,3
MAB	7	30,5
MOC	14	38,9
NAR	5	41,9
OIZ	8	46,7
PKY	15	55,7
PAL	5	58,7
PLT	8	63,5
PIU	8	68,3
PYM	3	70,1
PRE	4	72,5
PUM	11	79,0
QUA	12	86,2
SUN	13	94,0
TGM	6	97,6
VIRM	4	100,0
Total	167	

Se seleccionaron todos los puestos de trabajo en los que existe exposición a disolventes y que se consideran de riesgo (figura 14).

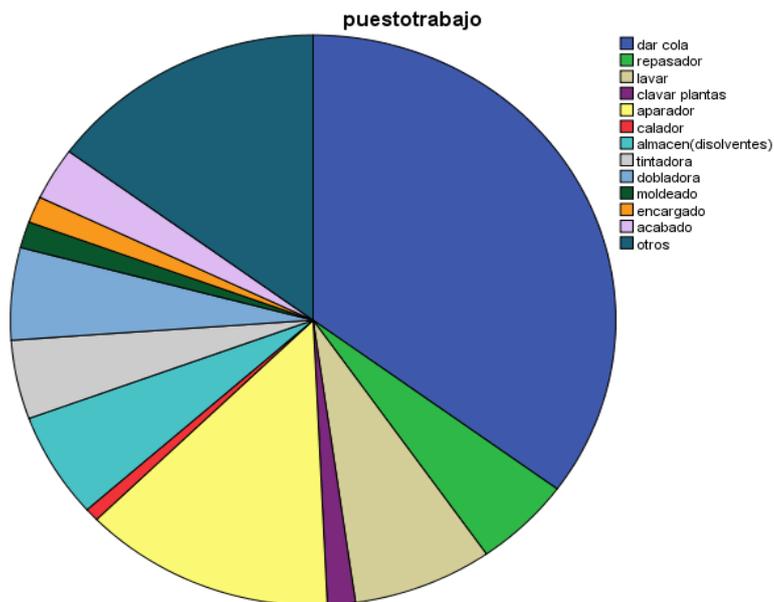


Figura 14. Puestos de trabajo relacionados con los trabajadores seleccionados

La mayor parte de los puestos muestreados son de dar cola y de aparado (48,5% de la muestra) (tabla 17)

Tabla 17. Porcentaje de trabajadores relacionados con cada puesto de trabajo

Puesto de Trabajo	Porcentaje
Dar cola	35,1
Repasador	5,2
Lavar	7,5
Clavar plantas	1,5
Aparador	13,4
Calador	0,7
Almacén(disolventes)	6,0
Tintadora	4,5
Dobladora	5,2
Moldeado	1,5
Encargado	1,5
Acabado	3,0
Otros	14,9
Total	100,0

Así mismo se seleccionó un grupo control constituido por 105 trabajadores con una media de edad de 45,6 años (rango: 24 - 65 años), 41 hombres y 64 mujeres pertenecientes a empresas que realizan actividades en las que no se emplea ningún tipo de agente químico. Se descartó, a su vez, que los trabajadores del grupo control estuvieran expuestos a algún agente de riesgo tóxico de origen extra laboral.

3.2. METODOLOGÍA

Con el fin de llevar a cabo los objetivos del estudio, a todos los trabajadores seleccionados se les realizaron los siguientes estudios:

- Control higiénico-clínico y ambiental, mediante visita a las empresas. Se realizó una anamnesis, exploración clínica, análisis hematológicos y de orina dentro de los exámenes de salud rutinarios llevados a cabo por el servicio de prevención correspondiente. Al mismo tiempo se realizó el pase de la encuesta (anexo III) y un control ambiental para determinar las concentraciones ambientales de los disolventes a los que están expuestos los trabajadores.
- Control biológico de los disolventes mediante el análisis de los metabolitos de los disolventes en muestras de orina recogidas al final de la jornada y semana laboral, tal como se establece en los VLB para los disolventes objeto de estudio.
- Genotipado de enzimas CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 a partir de muestras de mucosa bucal, obtenidas durante la realización de los exámenes de salud.
- Cuantificación del mRNA de CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 en muestras de sangre obtenidas en recipientes específicos.

- Análisis de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica para detectar la presencia de un efecto biológico irreversible como resultado de un efecto tóxico debido a disolventes.

3.2.1. CONTROL HIGIÉNICO-CLÍNICO

La valoración de las condiciones higiénico-clínicas de los puestos de trabajo fue realizada mediante visita a la empresa en jornada de trabajo, aprovechando los exámenes de vigilancia de la salud que se realizan a los trabajadores de forma periódica por los servicios de prevención de la salud en colaboración con la Universidad Miguel Hernández, al mismo tiempo que se realiza la recogida de muestras ambientales por el técnico higienista del servicio de prevención para el control ambiental de la exposición.

En los reconocimientos médicos se llevó a cabo una anamnesis que incluye antecedentes de posibles patologías familiares y laborales, hábitos tóxicos; se realizó una exploración clínica completa, análisis hematológicos y de orina. En caso de detectar alguna anomalía previa en estos reconocimientos, podría ser aconsejable la exclusión del paciente y no podría formar parte del estudio.

Al mismo tiempo que se procede a la toma de muestras para realizar el análisis, se les entrega a los trabajadores una encuesta higiénica, con una doble finalidad:

- Detección de factores laborales y/o extralaborales que pudiesen influir sobre los indicadores biológicos
- Determinar que individuos presentan una sintomatología clínica subjetiva de neurotoxicidad por disolventes

En el cuestionario elaborado que se pasa a los trabajadores, se diferencian dos apartados claramente definidos:

En el primer apartado se estudian:

- Condiciones higiénicas (puesto de trabajo actual, tiempo de exposición a disolventes). Consumo de tabaco y alcohol.
- Medidas de protección utilizadas por los trabajadores.
- Hábitos de higiene personal seguidos por los trabajadores durante la manipulación de disolventes
- Antecedentes médicos personales.

El segundo apartado consta de un cuestionario de salud complementario y un cuestionario de detección de síntomas neuropsiquiátricos por exposición a tóxicos (versión reducida del EUROQUEST) (Adaptación al idioma español de la versión original de Chouanière y cols., 1997, realizada por Marhuenda y cols., 2006) (que está incluido tanto en el anexo III para trabajadores expuestos, como en el anexo VII para no expuestos o controles).

Se pregunta también en esta encuesta el uso/consumo de fármacos de forma habitual para poder valorar posteriormente la posibilidad de que estas sustancias influyan a nivel metabólico.

Todos los trabajadores (expuestos y controles) son informados verbalmente del objetivo del estudio, solicitando su permiso para la toma de muestras y la firma del correspondiente consentimiento informado. La metodología utilizada en el estudio cumple con las directrices establecidas por la Comisión de Ética en la Investigación Experimental (CEIE) de la Universidad Miguel Hernández (en la actualidad el Órgano evaluador de Proyectos), que emitió el correspondiente informe favorable para su desarrollo.

3.2.2. CONTROL AMBIENTAL DE LA EXPOSICION

3.2.2.1. Técnicas de muestreo

La determinación de los contaminantes presentes en el ambiente laboral se realizó mediante monitorización ambiental utilizando monitores personales equipados con tubos de carbón activo (100/50mg) y bombas de muestreo de caudal regulable (mod. Scort ELF y Kit Germani de MDA) que cumplen con la norma UNE-EN 1232.

Los muestreadores se colocan a los trabajadores seleccionados, lo más cerca posible de las vías respiratorias y sujetos a la solapa. Los tubos de carbón son cambiados cada 50 minutos para evitar posibles saturaciones. Una vez que son retirados se envían al laboratorio para su análisis.

3.2.2.2. Método analítico

El análisis cuantitativo se llevó a cabo utilizando la técnica de Cromatografía de gases siguiendo el método recomendado por el NIOSH (1977), desorbiendo los disolventes del carbón con una disolución de n-propilbenceno (patrón interno) en sulfuro de carbono al 0.1% (Merck, grado de pureza analítico Darnestadt, RFA) y realizando la cuantificación en un cromatógrafo de gases Helwet-Packard 5710 con columna de acero inoxidable de 6 m de longitud y 1/8 pulgadas de diámetro, rellena de FFAP al 10% sobre Chromosorb W-AW 80-100 mallas y detector FID.

Las condiciones cromatográficas son las siguientes: Temperatura del horno 75°C, Temperatura del bloque de inyección 200°C, Temperatura del detector 200°C, caudal de gas portador (helio) 1 ml/minuto, split 1/100. El límite de detección es inferior a 3 mg/m³. Mediante las áreas de los picos de distintos disolventes, se determina la cantidad de los mismos presentes en la muestra y a partir de estos valores se calculan las concentraciones ambientales en función del tiempo y del caudal pasado por el adsorbente.

3.2.3. CONTROL BIOLÓGICO. CUANTIFICACIÓN DE LOS DISOLVENTES DETECTADOS EN EL AMBIENTE DE TRABAJO

El control biológico de los disolventes, se lleva a cabo mediante la determinación de los diferentes indicadores biológicos propuestos por el INSHT:

- El tolueno, principal contaminante detectado en los puestos de trabajo, mediante la determinación de su metabolito en orina, el ácido hipúrico.
- Los xilenos, mediante la cuantificación de sus metabolitos en orina: los ácidos orto, meta y para metilhipúricos
- El n-hexano, tradicionalmente componente mayoritario de las colas que se utilizan en la industria del calzado, mediante la determinación de su metabolito, la 2,5-hexanodiona en orina, (fracciones total y libre).

3.2.3.1. Método de cuantificación de 2,5-hexanodiona.

El método de cuantificación de la 2,5-hexanodiona, metabolito de n-hexano, se realiza de acuerdo al método publicado por Perbellini y cols., (1990), con modificaciones para la 2,5-HD libre (Cardona y cols., 1996). De cada muestra de orina recogida a final de turno, se toman 5 ml que se someten a hidrólisis ácida (pH < 0.1, HCl, 100°C, 45 min) para la determinación de la 2,5-HD total y 5 ml que se analizan sin tratamiento ácido para la determinación de la 2,5-HD libre. Ambas alícuotas se pasan a través de minicolumnas de C18, eluyendo con acetonitrilo en agua al 5% y extrayendo con diclorometano conteniendo ciclohexanona (patrón interno). Los extractos se evaporan hasta un volumen de 0,2ml de los que posteriormente será inyectado 2µl en el cromatógrafo para su análisis

Las determinaciones se llevan a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent GM-7890 una columna capilar HP-5M 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (mod. 19091S-433, Agilent) y detector de Espectrometría de masas MS cuadrupolo mod. 5975. Modo de ionización de Impacto electrónico y adquisición en modo SIM.

Las condiciones operativas del cromatógrafo de gases fueron las siguientes:

- temperatura del bloque de inyección 200°C,
- temperatura del detector 225°C,
- temperatura inicial del horno 80°C durante 5 minutos,
- temperatura final del horno 200°C durante 7 minutos,
- gradiente de temperatura del horno 10°C/min,
- caudal del gas portador (hidrógeno) 1 ml/min, split 1/20.

Para el cálculo de las concentraciones finales en las muestras, se utilizan patrones de 2,5-hexanodiona pura, de concentración conocida que se utilizarán posteriormente por comparación de áreas de los picos obtenidos tanto en los patrones como en las muestras biológicas.

Las concentraciones urinarias encontradas para la 2,5-HD total y la 2,5-HD libre fueron posteriormente corregidas respecto a una densidad de 1024 mg/l. El límite de detección es de 0,02 mg/l.

3.2.3.2. Método de cuantificación del ácido hipúrico y los isómeros metil hipúrico

La cuantificación de los ácidos, hipúrico (HA) y metil hipúricos (mHA) (orto, meta y para), metabolitos del tolueno y xilenos, se lleva a cabo repectivamente, en las muestras de orina mediante técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV de onda fija.

Se realiza simultáneamente el análisis de HA y mHA, utilizando el kit de Chromsystem: De las muestras de orina, almacenadas a -25°C hasta su análisis, se toma $10\mu\text{l}$ y se añade 1 ml de patrón interno. se centrifuga 15 minutos a 9000 rpm e inyecta $20\mu\text{l}$ en el cromatógrafo. Todas las muestras contienen control interno para la posterior cuantificación.

El equipo utilizado es de la marca Shimadzu (mod. SCL-10AVP). Las condiciones operativas del cromatógrafo líquido fueron las siguientes:

- Modo isocrático
- Columna de acero inoxidable 15 cm x 0.4 cm (Teknokroma, Barcelona), rellena de sílice funcionalizada con C18 (grosor de partícula de $0.5\mu\text{m}$)
- Velocidad de 1 ml/min
- Lectura de absorbancia a 207 nm

Para el cálculo de las concentraciones, se utiliza un estándar de concentración conocida con el cual compararemos posteriormente las áreas obtenidas de las muestras analizadas.

El límite de cuantificación es de 15 mg/l. La concentración urinaria encontrada para cada uno de los metabolitos se corrige posteriormente respecto a la concentración de creatinina en orina de cada trabajador.

3.2.4. MÉTODO DE ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS MÁS COMUNES DE LAS ENZIMAS CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 EN LAS MUESTRAS DE MUCOSA BUCAL RECOGIDAS MEDIANTE FROTIS DE MEJILLA

Para llevar a cabo el análisis de los polimorfismos de las enzimas CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 se utilizan muestras de mucosa bucal obtenidas mediante frotis de mejilla. Se utilizan dos torundas de algodón estériles por trabajador, una para cada mejilla. El procedimiento para la toma de muestra consiste en frotar en condiciones higiénicas durante 30 segundos la cara interior de la mejilla con rotación de la torunda y repetir la operación con la otra

torunda en la otra mejilla. La toma de muestra se puede realizar en cualquier momento del día, no siendo necesario el ayuno previo. La cavidad oral no debe contener restos de alimentos, medicamentos o tabaco. Las muestras son conservadas a 4°C hasta su análisis.

3.2.4.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

El protocolo de extracción y purificación de DNA a partir de frotis de mucosa bucal con torundas estériles de Dacron, realiza una lisis celular con proteinasa K y precipitación salina de proteínas y de DNA con isopropanol (Método de Sambrook modificado), (Sambrook, 2001).

Para la extracción del DNA se realizan los siguientes pasos:

- 1.- Se atemperan los tubos durante 15' a temperatura ambiente.
- 2.- Se introduce la torunda en un tubo eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de PBS, y se deja reposar durante 30 min.
- 3.- Se corta el extremo de la torunda, se cierra el tubo y agitamos en vortex con intensidad media, durante 1 minuto. Se extrae la torunda con cuidado y se guarda en el tubo original de la muestra.
- 4.- Se centrifuga a 7500 rpm durante 5 min, y se verifica la existencia de pellet. En caso de no haber, se vuelve a introducir la torunda y se deja otros 30 min, repitiendo los pasos anteriores.
- 5.- Se retira el PBS y se añaden 200 µl de buffer de lisis para mucosa bucal (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, SDS 1% pH 8,4).
- 6.- Se añaden 2 µl de proteinasa K y se agita.
- 7.- Se incuba a 55 °C durante 2 horas.
- 8.- Se inactiva la proteinasa a 95 °C durante 10 min.
- 9.- Se añaden 80 µl de ClNa al 6M y se agita.
- 10.- Se centrifuga a 4 °C durante 30 min a 3500 rpm.
- 11.- Se recoge con cuidado el sobrenadante sin arrastrar el pellet. Si es necesario volvemos a centrifugar 5 min a 7000 rpm.
- 12.- Se añaden 280 µl de isopropanol frío y 2 µl de glicógeno, y agitamos

- 13.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min.
- 14.- Comprobamos la existencia de pellet y retiramos el sobrenadante.
- 15.- Se añade 1 ml de etanol absoluto frío y se agita.
- 16.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min.
- 17.- Comprobamos la existencia de pellet y retiramos el sobrenadante.
- 18.- Dejamos secar a temperatura ambiente durante 2-3 horas.
- 19.- Se resuspende el pellet en 60 µl de agua destilada.
- 20.- Se incuba a 40 °C durante 1 hora.
- 21.- Medimos la cantidad de DNA y su pureza, espectrofotométricamente A260/A280.

3.2.4.2. Genotipado de CYP2E1

3.2.4.2.1. Genotipado de CYP2E1 alelo 5B (CYP2E1*5B)

Se emplea el método de genotipado del alelo 5B del gen CYP2E1 descrito por Cai y cols (2005) de amplificación por PCR y reconocimiento del cambio nucleotídico con el enzima de restricción PstI. En resumen, se amplifica un fragmento de 553 bp que contiene el sitio polimórfico que es reconocido por la enzima PstI y que da lugar a fragmentos de 553/435/118 en el caso de heterocigotos c1/c2 y de fragmentos de 435/118 en el caso de homocigotos de corte c2/c2. El homocigoto silvestre (wild type) de 553 bp no es digerido y constituye el tipo c1/c1. La secuencia de oligonucleótidos y condiciones de PCR son:

NOMBRE	SECUENCIA
CYP2E1*5B	5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3' 5'-AGA CCT CCA CAT TGA CTA GC-3'
PCR-Programa	DESNATURALIZACIÓN 94°C-5' AMPLIFICACIÓN: 35 CICLOS: 94°-30"/58°-30"/72°-1' ELONGACIÓN FINAL 72°-10'

Se prepara la reacción de amplificación para un volumen total de 25 µl en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un blanco en cada serie que contiene todos los reactivos menos muestra de DNA. Las cantidades y concentraciones de las soluciones stock de cada uno de los reactivos son las que están descritas en la tabla 18:

Tabla 18. Concentraciones y cantidades utilizadas en la reacción de amplificación del genotipado de CYP2E1 ALELO 5B

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer	10x	2,5 mcl
Cl ₂ Mg	50 mM	2 mcl
dNTP	5 mM	1 mcl
Mix oligonucleótidos	10 pmoles/mcl	0,5 mcl
Taq polimerasa Fire	1u/mcl	1 mcl
Muestra DNA		10 mcl
Agua		8 mcl
Volumen total		25 mcl

Se verifica la reacción de amplificación y se corren las muestras en gel de agarosa al 2%, se leen los resultados en transiluminador y se registra la imagen en sistema de fotodocumentación UVIDOC.

Un volumen variable de producto amplificado según la intensidad de las bandas obtenidas (entre 10-15µl) se somete a la acción de la enzima de restricción Pst I overnight a 38°C. Las condiciones son las siguientes:

Tabla 19. Concentraciones y cantidades de reactivos utilizadas en la reacción digestión. CYP2E1*5B

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer digestión R+	10x	2,5 mcl
Enzima PstI	1u/mcl	0,5 mcl
Producto PCR		15 mcl
Agua		7 mcl
Volumen total		25 mcl
Condiciones de restricción: Baño 38° durante 1 noche		

La lectura de resultados se realiza en gel de agarosa al 2 %. Se cargan 10 µl de producto digerido más 1,5 µl de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45' tras los que se realiza la lectura y registro de los tres patrones posibles que corresponden a los tres genotipos analizados para CYP2E1*5B

3.2.4.2.2. Genotipado de CYP2E1 alelo 6 (CYP2E1*6)

Se empleó inicialmente el método de genotipado del alelo 6 del gen CYP2E1 descrito por Brockmüller y cols. (1996) de amplificación por PCR y reconocimiento del cambio nucleotídico con en enzima de restricción DraI. Sin embargo a partir del DNA obtenido de frotis de mucosa yugal no fue posible la amplificación de un fragmento del tamaño esperado con la pareja de oligonucleótidos descrita por Brockmüller. Por ello se volvió a estudiar la secuencia y a rediseñar otra nueva pareja de oligos con menos estructuras secundarias, se obtuvo la pareja **AC/2E1*6-F/ AC/2E16-R**, con esta pareja y la

adición al master mix de DMSO si fue posible el genotipado de este polimorfismo con las condiciones también reseñadas en la tabla.

En el proceso de optimización del genotipado del alelo *6, se diseñaron varias parejas de nucleótidos distintas, para ver cual funcionaba mejor. Se utilizó la pareja que da lugar a un amplicón de 372 bp

AC/2E1*6-F	5'-AGT CGA CAT GTG ATG GAT CC-3'
AC/2E16-R	5'-ACA GGG TTT CAT CAT GTT GG-3'
AMPLICON	372 bp

PCR-Programa

CSAT

DESNATURALIZACIÓN: 94°-10'

AMPLIFICACIÓN:

5 ciclos 94°-30''/60°-30''/72°-45''

20 ciclos 94°-30''/60°-30''/72°-45''

9 ciclos 94°-30''/50°-30''/72°-45''

ELONGACIÓN FINAL: 72°-10'

Se prepara la reacción de amplificación para un volumen total de 25 µl en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un blanco en cada serie que contiene todos los reactivos menos muestra de DNA. Las cantidades y concentraciones de las soluciones stock de cada uno de los reactivos son las que están descritas en la tabla 20:

Tabla 20. Concentraciones y cantidades utilizadas en la reacción de amplificación del genotipado de CYP2E1*6

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer	10x	2,5 mcl
Cl ₂ Mg	25 mM	1,5 mcl
dNTP	5mM	0,75 mcl
Mix oligonucleótidos	10 pmoles/mcl	0,75 mcl
DMSO		1 mcl
Taq polimerasa Fire	1u/mcl	1 mcl
Muestra DNA		10 mcl
Agua		7,5 mcl
Volumen total		25 mcl

Se verificó la reacción de amplificación y se corrieron las muestras en gel de agarosa al 2%, se leyeron los resultados en transiluminador y se registraron las imágenes en sistema de fotodocumentación UVIDOC.

Un volumen variable de producto amplificado según la intensidad de las bandas obtenidas (entre 10-15µl), se somete a la acción de la enzima de restricción DraI overnight a 38°C. Las condiciones son las siguientes:

Tabla 21. Condiciones de digestión con Dral en el genotipado de CYP2E1*6

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer Tango	10x	2,5 mcl
Enzima Dral	10 u/mcl	0,5 mcl
Producto PCR		15 mcl
Agua		7 mcl
Volumen total		25 mcl
Condiciones de restricción: Baño 38° durante 1 noche		

La lectura de resultados se realizó en gel de agarosa al 2 % y se cargaron 10 µl de producto digerido más 1,5 µl de tampón de carga. La electroforesis tuvo lugar a 120 V durante 45' tras los que se realizó la lectura y se registraron los tres patrones posibles de corte que corresponden a los tres genotipos analizados para CYP2E1*6

3.2.4.3. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTM1

Consiste en una múltiplex, es decir en la amplificación simultánea en el mismo tubo de reacción de dos fragmentos, uno del gen GSTM1, y el otro del gen de la albúmina de 350 bp, que se utiliza como control interno que permite verificar fallos de ampliación, descartando falsos negativos. Las parejas de oligonucleótidos son las descritas a continuación para cada uno de los genes por Bell y cols. (1993) para GSTM1. Las condiciones de amplificación se optimizan variando las temperaturas de emparejamiento y las concentraciones de cada pareja de oligonucleótidos para obtener unas intensidades de banda similares en cada uno de los fragmentos correspondientes a GSTM1 y al

Tabla 22. Concentraciones y cantidades utilizadas en la reacción de amplificación del genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTM1

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer	10x	2,5 mcl
Cl ₂ Mg	50 mM	1 mcl
dNTP	5mM	1 mcl
Mix oligonucleótidos Albúmina/Albúmina-R	10 pmoles/mcl	2,5 mcl
Mix oligonucleótidos GSTM1/GSTM1-R	10 pmoles/mcl	3 mcl
Taq polimerasa	5 u/mcl	0,1 mcl
Muestra DNA mucosa yugal		7 mcl
Agua		7,9 mcl
Volumen total		25 mcl

La lectura de resultados se realiza en gel de agarosa al 2 % al que se añade bromuro de etidio 2,5 µl (10 mg/ml). Se cargan en cada pocillo del gel 10 µl de producto amplificado más 1,5 µl de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45', tras los que se realiza la lectura en transiluminador y se registra la imagen obtenida en sistema de fotodocumentación UVIDOC.

3.2.4.4. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTT1

El genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTT1, inicialmente se utilizó el método descrito por Arand y cols. (1996), mediante un PCR-Multiplex con dos parejas de oligonucleótidos, una correspondiente a un fragmento del gen de la albúmina que sirve como control positivo de amplificación que da lugar a una banda en todas las calles de 350 bp, obteniéndose en el caso de presencia de GSTT1 un fragmento de 480bp.

Al trabajar con DNA extraído de mucosa yugal, el fenómeno de apoptosis lleva a la generación de fragmentos de menos de 200 bp por lo que se obtuvieron inicialmente, frecuentes falso negativos. Por ello se procedió a rediseñar una pareja de oligonucleótidos de menor tamaño dirigidos al exón 6 del gen GSTT1 localizado en el cromosoma 22 (22q11.2). Para ello se utilizó el programa Primer3 versión 4.0.0 y la secuencia de GSTT1 ENSG00000184674 con el que se obtuvieron la pareja de oligonucleótidos que reflejamos a continuación que dan lugar a la ampliación de un fragmento de 160 bp en caso de presencia del gen en homocigosis y heterocigosis y a una no ampliación en el caso de delección del mismo.

NOMBRE	SECUENCIA
Albúmina	5'-GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C-3' 350 bp
Albúmina-R	5'-GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC-3'
GSTT1 E6-F	5'-GAC CCC ACC ATA AAG CAG AA-3' 160 bp
GSTT1 E6-R	5'-TCT TAG GCA AGC CAT TCC TG-3'
PCR- Programa	CSAT
	DESNATURALIZACIÓN: 94°-5''
	AMPLIFICACIÓN:
	5 ciclos 94°-30''/60°-30''/27°-45''
	20 ciclos 94°-30''/60°(-0,5°)-30''/72°-45''
	9 ciclos 94°-30''/50°-30''/72°-45''
	ELONGACIÓN FINAL 72°-10'

En la tabla 23 se detallan los oligonucleótidos empleados y las condiciones de amplificación.

Tabla 23. Concentraciones y cantidades utilizadas en la reacción de amplificación del genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTT1

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer	10x	2,5 mcl
Cl ₂ Mg	25 mM	3 mcl
dNTP's	5mM	1 mcl
Mix oligonucleótidos	10 pmoles/mcl	2 mcl
Xilencianol, ficoll	0,5% p/v	1,5 mcl
Taq polimerasa Fire	1u/mcl	1 mcl
Muestra		3 mcl
Agua		11 mcl
Volumen total		25 mcl

Se preparó la reacción de amplificación para un volumen total de 25 µl en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un control positivo en cada serie que contiene todos los reactivos menos la muestra de DNA.

La lectura de resultados se realizó en gel de agarosa al 2% al que se añaden 2,5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se cargan en cada pocillo del gel 10 µl de producto amplificado más 1,5 µl de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45 minutos, tras los que se lleva a cabo la lectura en transiluminador y se registra la imagen obtenida en sistema de fotodocumentación UVIDOC

3.2.4.5. Genotipado del polimorfismo RS 1695 Ile105Val del gen GSTP1

El genotipado del polimorfismo RS 1695 Ile105Val del gen GSTP1, en el que una transición en el codón 105 provoca una sustitución de isoleucina por valina, mostrando este alelo una menor actividad enzimática y menor capacidad de detoxificación, se realiza siguiendo el método descrito por Jerónimo y cols. (2002). En resumen consiste en una amplificación de un fragmento del gen de 176 bp que posteriormente se somete a la acción de la enzima de restricción Alw261 durante 2 horas a 37°, que reconoce diferencialmente el polimorfismo A→G del exón 5 de GSTP1, dando lugar a dos fragmentos de 91 y 85 bp en los homocigotos val/val, (GG) y de fragmentos de 176 bp, 91bp y 85 bp en el caso de los heterocigotos Ile/Val (GA). El homocigoto salvaje (wild type) de 176 bp no es digerido y constituye el tipo Ile/Ile (AA). La secuencia de oligonucleótidos y condiciones de PCR se exponen a continuación:

NOMBRE	SECUENCIA
GSTP1-105F	5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'
GSTP1-105R	5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3'
PCR-Programa	CSAT
	DESNATURALIZACIÓN: 95°-5'
	AMPLIFICACIÓN:
	5 ciclos 94°-30"/60°-30"/27°-45"
	20 ciclos 94°-30"/60°(-0,5°)-30"/72°-45"
	9 ciclos 94°-30"/50°-30"/72°-45"
	ELONGACIÓN FINAL 72°-10'

Se preparó la reacción de amplificación para un volumen total de 25 µl en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda). Las cantidades y concentraciones de las soluciones stock de cada reactivo se describe en la tabla siguiente:

Tabla 24. Concentraciones y cantidades utilizadas en la reacción de amplificación del genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTP1

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer	10x	2,5 mcl
Cl ₂ Mg	25 mM	1,5 mcl
dNTP's	5mM	1 mcl
Mix oligonucleótidos	10 pmoles/mcl	1 mcl
Xilencianol, ficoll	0,5% p/v	1,5 mcl
Taq polimerasa	1u/mcl	1 mcl
Muestra		5 mcl
Agua		11,5 mcl
Volumen total		25 mcl

Se verifica la reacción de amplificación y se corren las muestras en gel de agarosa al 2%, se elle los resultados en transiluminador y se registra la imagen en sistema de fotodocumentación UVIDOC. Un volumen variable de producto amplificado, según la intensidad de las bandas obtenidas (entre 10-15 µl) se

somete a la acción de la enzima de restricción Alw261 dos horas a 37°C. Las condiciones son las siguientes:

Tabla 25. Concentraciones y cantidades de reactivos utilizadas en la reacción digestión. GSTP1

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCIÓN
Buffer Digestión R+	10x	2,5 mcl
Enzima Alw261	10 u/mcl	0,5 mcl
Producto PCR		15 mcl
Agua		7 mcl
Volumen total		25 mcl
Condiciones de restricción: Baño 37° durante 2 horas		

La lectura de resultados se realiza en gel de agarosa al 2%. Se cargan 10 µl de producto digerido y 1,5 µl de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45 minutos tras los que se realiza la lectura y registro de los tres patrones posibles que corresponden a los tres genotipos analizados para GSTP1 Ile105Val

3.2.5. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN A TIEMPO REAL DEL mRNA DE CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 MEDIANTE RT-PCR EN MUESTRAS DE SANGRE.

La determinación de la expresión de los genes CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 que se ha realizado mediante la cuantificación del mRNA específico a partir de muestras de sangre total puede representar una alternativa óptima para estimar la actividad hepática de estas enzimas (Haufroid y cols., 2001).

3.2.5.1. Purificación del arn celular a partir de sangre total obtenida en los tubos paxgene para RNA

Partimos de la extracción de 2,5 ml de sangre venosa en tubos especiales que contienen un conservante y estabilizador del RNA (Paxgene blood RNA tube, BD). Una vez realizada la extracción se invierte el tubo de 8 a 10 veces. Las muestras se conservan a -20°C hasta la realización del análisis.

Se llevó a cabo utilizando el Kit Paxgene Blood RNA de Qiagen, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Centrifugar el tubo PAXgene para RNA a partir de sangre 10 minutos a 4.500 rpm.
2. Eliminar el sobrenadante con pipetas Pasteur estériles. Añadir 5 ml de agua libre de RNAasas y cerrar el tubo con tapón Hemogard closure nuevo.
3. Vortex y centrifugar 10 minutos a 4.500 rpm. Aspirar y desechar todo el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 360 µl buffer BR1 (tampón de resuspensión) con el Vortex.
5. Pipetear la muestra en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Añadir 300 µl buffer BR2 (tampón de ligamento)+ 40 µl Proteinasa K, mezclar con vortex e Incubar 10 min a 55 °C en el termobloque con agitador a 400-1400 rpm.
6. Transferir el sobrenadante a un eppendorf estéril de 1,5 ml. Añadir 350 µl de etanol absoluto, vortex y pulso a máxima velocidad.
7. Añadir 700 µl de muestra a la spin column PAX gene y centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm. Pasar la columna a un tubo de procesado nuevo y eliminar el tubo que contiene el eluído.
8. Añadir el resto de la muestra a la columna y centrifugar durante 1 minuto, eliminar el tubo que contiene el eluído y transferir la columna a un tubo nuevo 10.000 rpm.
9. Añadir 700 µl BR3 buffer (tampón de lavado 1) a la columna, centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm. Pasar la columna a otro tubo y eliminar el eluído que queda en el tubo.

10. Añadir 500 µl buffer BR4 (tampón de lavado 2) sobre la spin column y Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm. Colocar la spin column en un tubo nuevo y descartar el tubo que contiene el eluído.
11. Añadir otros 500 µl de buffer BR4 a la columna y Centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm. Desechar el eluído y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad para secar bien la columna.
12. Para eluir, eliminar el tubo con el eluído y pasar la columna a un eppendorf de 1,5 ml estéril. Añadir 40 µl de buffer BR5 (tampón de elución) sobre la spin columna centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm.
13. Repetir el paso anterior de elución con 40 µl buffer BR5 usando el mismo tubo de centrífuga.
14. Incubar el volumen eluído (eluato) durante 5 minutos a 65 °C en el termobloque.
15. Pasar a hielo triturado y mantenerlo ahí durante 10 minutos.
16. Congelar a -80°C.

3.2.5.2. Reacción de retrotranscripción

El RNA total extraído mediante el procedimiento anterior es transcrito inversamente con cebadores hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa MultiScribe RT enzyme utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem, Ref. 4322171) en un volumen de reacción final de 50 µl.

1. Se prepara la mezcla del kit en un tubo eppendorf de 1,5 ml pipeteando:
 - 200 µl: 10x TR Buffer
 - 80 µl: 25 x dNTP
 - 200 µl: 10 x Random Primers
 - 100 µl: Multiscribe RT
 - 420 µl: Agua libre de RNAasas
 - Volumen final = 1000 µl
2. Añadir a esta mezcla 1 µl de RNAasa inhibidor y agitar. Este volumen final es para 40 reacciones de 25 µl cada una.

3. Pipetear 25 μ l de la mezcla del kit en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml y Añadir a este tubo, 25 μ l de la muestra a analizar (volumen de reacción final 50 μ l).
4. Dejar a T ambiente los eppendorfs durante 10 min y en el termobloque a 37 °C durante 2 h.
5. Sacar las muestras convertidas a cDNA y congelarlas a -80 °C hasta su cuantificación mediante PCR.

3.2.5.3. Cuantificación mediante REAL TIME- PCR:

Se realiza utilizando el kit TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems Ref. 4304437) en un sistema de Detección de Secuencia TaqMan 7700 (PE Biosystems Cems.) utilizando el ensayo específico, dependiendo del enzima de que se trate: (Hs00559368_m1, PE Biosystems) para la enzima CYP2E1, (Hs01683722_gH, PE Biosystems) para la enzima GSTM1, (Hs00184475_m1, PE Biosystems) para la GSTT1 y (Hs02512067_s1, PE Biosystems) para la GSTP1.

La cDNA polimerasa AmpliTaq Gold es incluida en el TaqMan Universal PCR MasterMix. La reacción se inicia a 50° C durante 2 minutos para permitir la incorporación de dUTP y es incubada a 95° C durante 10 min para activar la polimerasa, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 15 s y se extiende a 60° C durante 1 min. En estas condiciones de PCR, se verifica que el DNA genómico (tamaño de fragmento teórico de 951 bp) no es amplificado.

La cuantificación se ha realizado mediante el método Ct comparativo previamente descrito por Livak y Schmittgen, 2001, utilizando como control endógeno β -actina (PE Biosystems, Ref 4352935E), previa comprobación de que las eficiencia son equivalentes para el target y el control endógeno y utilizando el trabajador sano no expuesto con menor valor de incremento de Ct,

como calibrador. Para llevar a cabo la reacción en cada pocillo de la placa de PCR se añade 12,5 µl de Taqman Universal PCR Master Mix, 10,5 µl de cDNA diluido en agua libre de RNAasas y 2 µl del ensayo (o 2 µl de β-actina). Cada muestra conteniendo el gen específico o β-actina se analiza por triplicado (3 pocillos con el gen específico y 3 con β-actina). Además en cada placa se han incluido dos controles negativos.

El método Ct comparativo calcula el nivel de expresión de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Cálculo de $\Delta C_{t\text{muestra}} = C_{t\text{target}} - C_{t\text{endógeno}}$
2. $\Delta\Delta C_{t} = \Delta C_{t\text{muestra}} - \Delta C_{t\text{calibrador}}$
3. Nivel de expresión: $2^{-\Delta\Delta C_{t}}$ (indica el nivel de expresión del gen en la muestra frente al nivel de expresión en el calibrador)

El método descrito es rápido y de fácil aplicación permitiendo el fenotipado para la expresión de las enzimas de grandes poblaciones en estudios epidemiológicos, programas de control y monitorización de trabajadores expuestos. La ventaja frente a los test clásicos utilizados para evaluar la actividad enzimática de CYP2E1 in vivo, basados en la hidroxilación de chlorzoxazone (CZX) por esta enzima, es que no está limitado por aspectos prácticos derivados de la administración del fármaco, con prescripción no disponible en muchos países, ni necesita múltiples muestreos de sangre y orina para llevarlo a cabo (Bolt y cols., 2003); (Mendoza-Cantú y cols., 2006).

3.2.6. ANÁLISIS DE LOS MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

El método utilizado ha sido la técnica **CBMN**, *micronúcleos en células binucleadas* (Fenech y Bonassi, 2011).

3.2.6.1. Procesamiento de los cultivos para análisis de micronúcleos

El test se ha realizado a partir de una muestra de 2 ml de sangre fresca, recogida en un tubo estéril heparinizado,

Los cultivos de linfocitos de sangre periférica de 70 horas de duración, se han realizado según la técnica específica que se describe a continuación y establecida en el laboratorio del Servicio de Genética Médica del Hospital Ramón y Cajal, añadiendo citocalasina B a las 44 horas antes de finalizar el cultivo con el fin de bloquear la citoquinesis. Una vez finalizado el cultivo, las células se someten a la acción de una solución hipotónica suave que no rompa las membranas nucleares y se extenderán sobre portaobjetos tras su fijación

3.2.6.2. Técnica de análisis de micronúcleos en células binucleadas (CBMN)

Consta de las siguientes fases:

1. Preparación del medio de cultivo enriquecido.

- 500 ml de RPMI
- 10 ml de suero fetal
- 1,5 ml de Penicilina/Streptomycin
- 1,5 ml de Hepes
- 1,5 ml de Glutamina

2. Cultivo

- 6 gotas de Phitohemaglutininal
- 12 gotas de sangre
- Incubar en estufa a 37° C
- A las 44 horas de cultivo añadir una concentración de 6 µg/ml de Citocalasina-B (disuelta en DMSO)
- A las 70 h proceder al sacrificio de la muestra.
- 1,5ml de Glutamina

3. Sacrificio de los cultivos

- Pasar la sangre a un tubo de centrifuga y centrifugar 10 min a 1.500 rpm.
- Quitar el sobrenadante y añadir primero 1ml de RPMI mezclar y añadir 4 ml de RPMI.
- Quitar el sobrenadante y añadir primero 1ml de CIK 0,075M mezclar con cuidado y después añadir 4 ml de CIK y volver a mezclar con cuidado.
- Dejar actuar durante 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar 10 min a 1.500 rpm.
- Quitar el sobrenadante y añadir primero 1 ml de Carnoy (fijador) (5:1metanol/acético) y mezclar con cuidado y después añadir otros 4 ml de Carnoy 5:1 resuspendiendo.
- Dejar actuar durante 20 min a temperatura ambiente. Centrifugar 10 min a 1.500 rpm
- Quitar el sobrenadante y añadir 0,5-1ml de Carnoy mezclando bien.
- Extender sobre un porta y fijar.

4. Análisis de micronúcleos

- De cada muestra recibida, se han analizado 1000 células binucleadas, determinándose los siguientes parámetros:
 - . Micronúcleos por 1000 células binucleadas.
 - . Puentes de cromatina por 1000 células binucleadas.
 - . “Buds” o amplificaciones por 1000 células binucleadas.

- . Número de células mononucleadas por 1000 células binucleadas.
- . Número de células tri/tetranucleadas por 1000 células binucleadas.
- . Número de Micronúcleos en células tri/tetranucleadas por 1000 binucleadas.
- . Índice de proliferación celular.

Esta técnica, tras su estandarización usando el bloqueo de la citocinesis con citocalasina B (CBMN), es capaz de detectar un daño genotóxico aunque el efecto sea muy bajo. Al ser de fácil aplicación tanto en poblaciones humanas como experimentalmente, es una alternativa para estudios a gran escala, sobre todo en el caso de monitorización o seguimiento de grandes grupos de población y frente a las técnicas convencionales que se han utilizado en el caso de exposiciones ambientales a genotóxicos y que presentan el inconveniente de que son muy costosas en el tiempo, como es el caso de las aberraciones cromosómicas.

3.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos tanto de la encuesta higiénico-clínica como del control ambiental y biológico y del estudio toxicogenético se han informatizado para su tratamiento estadístico.

Se han codificado las variables cualitativas o semicuantitativas para permitir su análisis estadístico. El análisis estadístico se ha realizado con el programa estadístico PASW Statistics 2.0.

3.3.1. ESTADÍSTICA BÁSICA

Se ha realizado un análisis estadístico descriptivo de todas las variables obtenidas de la encuesta higiénico-clínica, control ambiental y control biológico

y del estudio toxicogenético, mediante el análisis de la distribución de frecuencias de las variables cualitativas y la obtención de los parámetros estadísticos básicos en el caso de las variables cuantitativas (media aritmética y geométrica, desviación estándar, mediana y valores máximos y mínimos). Asimismo, se ha realizado un análisis descriptivo de una variable según subgrupos de otra, tanto en el caso de una variable cuantitativa en función de una cualitativa, como en el de dos variables cualitativas.

3.3.2. COMPARACIÓN DE MEDIAS

Se efectuó la comparación de medias entre grupos definidos de variables cualitativas (variables obtenidas de la encuesta higiénico-clínica), y polimorfismos genéticos, según una variable cuantitativa (edad, años en el puesto de trabajo, niveles urinarios de indicadores biológicos, niveles ambientales, niveles de expresión de los enzimas, número de micronúcleos).

Se ha aplicado análisis de la varianza de medias (ANOVA) de una sola vía, utilizándolo como estadístico de contraste una F de Snedecor, previa comprobación de la homogeneidad de varianzas mediante test de Cochran C.

En los casos en los que no se pudo demostrar esta homogeneidad de varianzas y/o algún grupo tenía una $n < 30$, se realizó el análisis de la varianza de rangos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando el estadístico Chi cuadrado. Para variables cualitativas definidas en sólo dos grupos se ha utilizado el test estadístico de la t de Student para muestras independientes o su equivalente no paramétrico, la U de Mann-Whitney.

3.3.3 .MATRICES DE CORRELACIÓN

El análisis de la relación, entre variables cuantitativas (concentraciones ambientales de disolventes, niveles urinarios de los indicadores biológicos,

niveles de expresión de los enzimas, número de micronúcleos), se ha estudiado mediante matrices de correlación.

Dado que en general la media y mediana de estas variables no son iguales, podemos presumir que la distribución de los valores es asimétrica y por tanto no normal. Este alejamiento de la normal no podemos cuantificarlo ni conocer cuál es la forma funcional real de la distribución que siguen los datos, pero puesto que la muestra es grande ($n > 30$), podemos aplicar el Teorema del Límite Central y suponer que las medias muestrales se distribuyen de forma casi normal. Hemos comprobado que se cumple este teorema aplicando, para hallar un coeficiente de correlación concreto, el test no paramétrico para rangos de Spearman y el paramétrico de Pearson encontrando aproximadamente los mismos valores en ambos casos. Para encontrar entonces las probabilidades asociadas a valores específicos de la estadística hemos aplicado test paramétricos por permitir una mejor interpretación de los resultados.

El análisis de los datos mediante matrices de correlación nos ha dado información sobre la existencia o no de relación entre variables, la forma de esa relación (signo del coeficiente) y si es o no significativa (p).

4. RESULTADOS



4.1. CONTROL HIGIÉNICO CLÍNICO

El estudio se llevó a cabo en una muestra de 167 trabajadores expuestos, 67 hombres y 100 mujeres, con una media de edad de 43,0 años (rango: 19 – 64 años), procedentes de 21 diferentes empresas del calzado ubicadas en la provincia de Alicante, que utilizan disolventes dentro del proceso de producción (hexano, tolueno, acetona, heptano, isómeros de hexano, metiletilcetona, acetato de etilo, ciclohexano) y que se consideraron de riesgo. Todos los trabajadores desarrollaban su actividad laboral de lunes a viernes, con una media de 42,4 horas semanales de exposición a disolventes, y un rango de 3 - 55 horas. La media de la antigüedad en el puesto de trabajo fue de 10,4 años (rango: 4 meses – 40 años).

4.1.1. RESULTADOS DE LA ENCUESTA REALIZADA A LOS TRABAJADORES

Los resultados obtenidos en el pase de la encuesta realizada a cada uno de los trabajadores que forman parte del estudio, referidos a aspectos higiénico-laborales, medico-clínicos y los relativos a las medidas de protección durante el manejo y utilización de productos químicos se muestran en la tabla 26 (se señala el porcentaje afirmativo de los trabajadores que hacen uso de esas medidas).

Tabla 26. Condiciones higiénicas y medidas de protección utilizadas por los trabajadores

MEDIDA DE PROTECCIÓN	% AFIRMATIVO
Limitación del tiempo de exposición	65,6
Extracción de aire localizada (campana, extractor...)	61,2
Ventilación natural (ventanas y puertas abiertas...)	16,5
Ventilación forzada (extractores en ventanas o paredes)	38,8
Protección personal vías respiratorias (mascarilla, áscar con filtro)	49,6
Protección personal extremidades superiores (guantes)	43,7

Respecto a los hábitos de higiene personal seguidos por el trabajador, los resultados se muestran en la tabla 27, reflejando igualmente el porcentaje de respuesta afirmativa.

Tabla 27. Hábitos de higiene personal seguidos por los trabajadores durante la manipulación de disolventes

HABITOS DE HIGIENE PERSONAL	% AFIRMATIVO
Se ducha diariamente en la empresa	4,9
En caso negativo, se ducha diariamente en casa, al término de la jornada laboral	97,9
Se cambia de ropa al comenzar el trabajo	88,4
La ropa de trabajo le cubre todo el cuerpo (buzo o chaqueta y pantalón)	58,6
La ropa de trabajo y de calle se guardan en sitios separados	52,6
Ingiere alimentos en el puesto de trabajo	64,8
Se lava las manos antes del almuerzo	84,8
Hay una norma en la empresa que indique la necesidad de lavado de manos antes de las comidas	14,0
Se dispone de un local preparado especialmente para tomar bocadillo o comer	25,9

Respecto de los hábitos tóxicos, de los trabajadores expuestos los resultados se exponen en la tabla 28. Los trabajadores que tomaban alguna medicación en el momento del muestreo son cuestionados por el tipo de medicación que están tomando y los grupos de medicamentos son los siguientes: medicamentos antiinflamatorios, anticonceptivos, hipotensores, antihistamínicos y antialérgicos.

Tabla 28. Resultados de hábitos tóxicos

HÁBITOS	EXPUESTOS (%)	CONTROLES (%)
Fumar (> 5 cigarrillos/día)	43,2	30,9
Consumo de alcohol (diariamente)	35,7	30,4
Toman medicación (AINES y otros)	40,3	53,6

En relación al cuestionario complementario sobre síntomas neuropsiquiátricos subjetivos de toxicidad por disolventes, los resultados se muestran en la tabla 29. La frecuencia de presentación de los diferentes síntomas fue baja; los que se presentan en mayor porcentaje son la sensación de tener los nervios de punta, y la falta de ánimo.

Tabla 29. Cuestionario de salud complementario para trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (versión reducida del Euroquest)

¿Desde que trabaja con exposición a disolventes, nota alguna de las molestias siguientes?

SINTOMA	ALGUNAS VECES %	A MENUDO %	MUY A MENUDO %
1. Falta de fuerza en los brazos y/o en las piernas	24	7.5	2.7
2. Perdida de sensibilidad en las manos y/o pies	16.7	6.9	3.5
3. Vértigos	16.8	4.2	2.4
4. Nauseas/mareos	16.6	1.4	2.1
5. Sensación de tener los nervios de punta	44.8	14.7	4.9
6. Contrariado por cosas sin importancia	32.4	9.2	1.4
7. Cambios bruscos de humor	36.6	9.9	2.1
8. Falta de ánimo	44.8	9	2.1
9. Dificultad para contener su cólera	20.3	0.7	0.7
10. Tendencia a olvidar cosas	35.4	10.2	2.0
11. Necesidad de anotar cosas para recordarlas	35.2	8.3	4.1
12. Ha oído decir que está perdiendo la memoria	19.7	3.5	1.4
13. Excesiva o anormalmente cansado por la noche	39.6	20.8	3.5
14. Falta de energía	38.5	9.1	0.7
15. Problemas para conciliar el sueño	24.5	10.5	2.1
16. Despertarse sin razón durante el sueño	24.1	13.1	3.4
17. Garganta irritada (con ganas de toser todo el rato)	28.5	6.9	0.7
18. Mal sabor de boca	28.5	6.3	0.7

Hasta qué punto está de acuerdo o no con la frases siguientes?

SINTOMA	De acuerdo	Totalmente de acuerdo
19. en general soy sensible a las luces brillantes	26.8	29.0
20. en general soy sensible al ruido del tráfico la música y otros ruidos fuertes	26.4	22.1
21. me preocupo mucho por cosas sin importancia	23.9	21.7
22. con frecuencia tengo la sensación de que, en cualquier momento puede ocurrirme una desgracia	11.4	30.0
23. En general, me falta confianza en mí mismo	14.4	25.2

4.2. RESULTADOS DEL CONTROL AMBIENTAL

Los resultados de la evaluación ambiental realizada en las empresas indican que la exposición a disolventes en los puestos analizados es bastante baja (Tabla 30). El tolueno es el principal contaminante al que están expuestos los trabajadores. El n-hexano, sus isómeros, el heptano y otros contaminantes como la acetona, la metiletilcetona, el acetato de etilo y los xilenos estuvieron también presentes en el ambiente laboral, aunque a concentraciones medias muy por debajo de los valores límite ambientales (VLA-ED) propuestos por el INSHT para 2016. Algunos disolventes como el diclorometano y el ciclohexano no fueron detectados en ninguno de los puestos muestreados.

Tabla 30. Concentraciones de los disolventes en ambiente del puesto de trabajo (mg/m3)

Disolventes muestreados	VLA-ED	Mínimo	Máximo	Media	DS
Acetona	1210	4	431	174,4	172,3
Heptano	2085	3	50	14,2	15,5
Hexano	72	nd	24	6,2	8,8
Isómeros de hexano	1790	1	639	134,5	234,5
Metiletilcetona	600	4	303	48,8	102,8
Tolueno	192	14	283	90,1	102,8
Acetato de etilo	1460	5	59	22	17,9
Xilenos	221	nd	2	0,9	0,6
Ciclohexano	700	nd	nd	nd	nd
Diclorometano	177	nd	nd	nd	nd

n.d.: no detectado

4.3. RESULTADOS DEL CONTROL BIOLÓGICO

En la tabla 31 se recogen los valores de las concentraciones urinarias de los diferentes indicadores biológicos analizados en las muestras recogidas al final del turno, así como los valores encontrados de estos indicadores en los trabajadores no expuestos. Se indican también los valores límite actualmente recomendados por el INSHT (VLB o valor límite biológico) en España. Las concentraciones de las cetonas, acetona y metiletilcetona, no fueron cuantificables, con nuestro método, en ninguna de las muestras analizadas.

Los valores de los indicadores biológicos encontrados en los trabajadores expuestos fueron comunicados a los médicos del trabajo para su aplicación en prevención.

Tabla 31. Parámetros estadísticos relativos a las concentraciones de los indicadores biológicos en la orina recogida al final del turno de trabajo

EXPUESTOS	VLB	Mínimo	Máximo	Media	DS
Acido hipúrico (g/g creatinina)	1,6 g/g creat	n.d.	16,74	1,08	1,53
2,5-hexanodiona libre (sin hidrólisis) (mg/l)	0,4 mg/l	n.d.	1,87	0,08	0,18
2,5-hexanodiona total (hidrólisis ácida) (mg/l)	5 mg/l *	n.d.	9,2	0,87	1,29
Ácidos metilhipúricos (g/g creatinina)	1,5 g/g creat	0,01	0,93	0,18	0,18
Acetona (mg/l)	50 mg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metiletilcetona (mg/l)	2 mg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NO EXPUESTOS	VLB	Mínimo	Máximo	Media	DS
Acido hipúrico (g/g creatinina)	1,6 g/g creat	n.d.	1,52	0,51	0,36
2,5-hexanodiona libre (sin hidrólisis) (mg/l)	0,4 mg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,5-hexanodiona total (hidrólisis ácida) (mg/l)	5 mg/l *	n.d.	0,96	0,41	0,24
Ácidos metilhipúricos (g/g creatinina)	1,5 g/g creat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetona (mg/l)	50 mg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metiletilcetona (mg/l)	2 mg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado

*Valor límite biológico recomendado hasta el año 2003 para el control biológico de la exposición a n-hexano (la 2,5 hexanodiona total fue sustituida como indicador biológico por la 2,5 hexanodiona libre, sin hidrólisis ácida, a partir del año 2004).

Las concentraciones medias de ambos metabolitos encontradas en los controles fueron significativamente inferiores a las de los trabajadores expuestos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas tanto para el ácido hipúrico ($t=4,193$, $p<0,001$), como para la 2,5-hexanodiona total ($t=3,173$, $p<0,005$) (figuras 15 y 16).

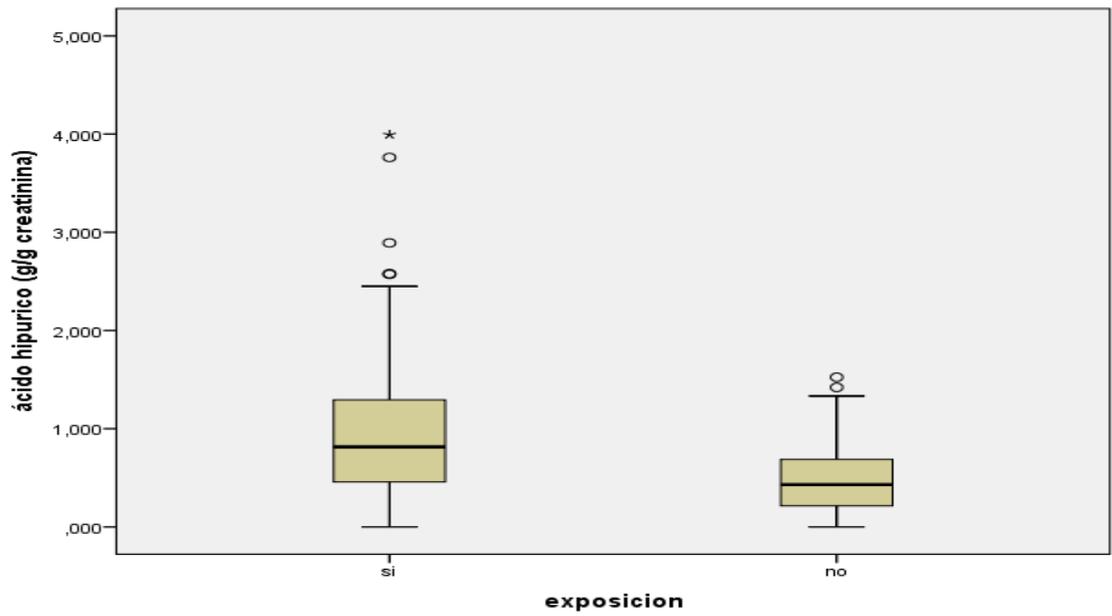


Figura 15. Concentraciones de ácido hipúrico en orina en expuestos y controles

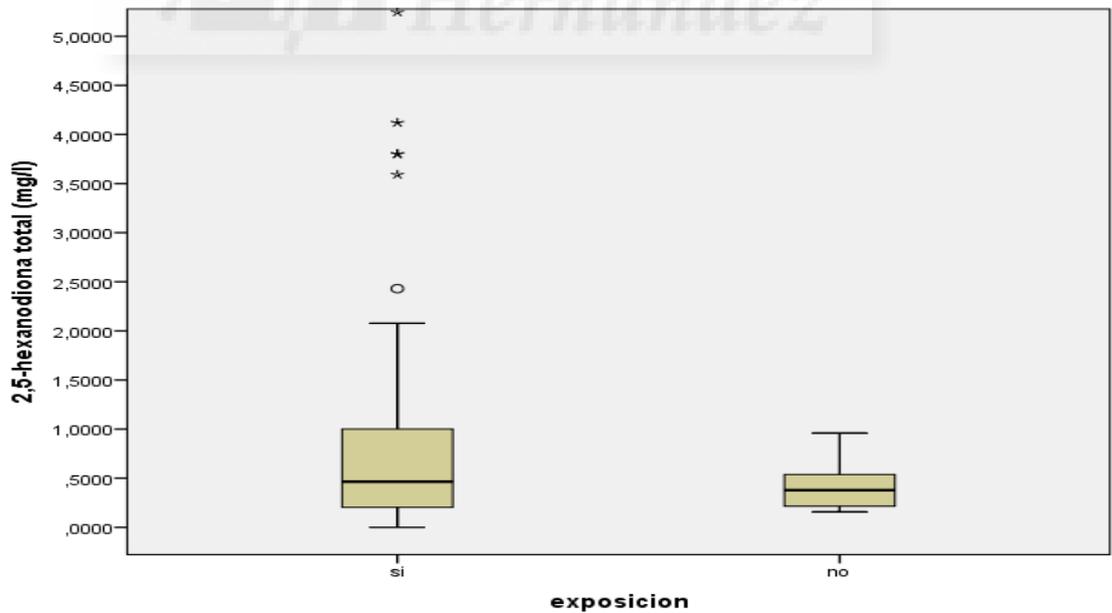


Figura 16. Concentraciones de 2,5-hexanodiona total en orina en expuestos y controles

4.4. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS DE LOS GENES CYP2E1, GSTM1, GSTP1 Y GSTT1

4.4.1. RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS (DNA) A PARTIR DE FROTIS DE MUCOSA BUCAL

Para la puesta a punto de la técnica se obtuvieron 69 muestras dobles de mucosa bucal de trabajadores no expuestos que se resuspendieron, cada muestra, en un volumen final de 60 μl de agua destilada estéril. Los valores medios obtenidos de concentración y pureza (A_{260}/A_{280}) y sus desviaciones estándar, son de $165,81 \pm 61,64$ ng/ μl y $1,71 \pm 0,21$ ng/ μl respectivamente, y los valores máximos y mínimos de concentración son 284 y 18 ng/ μl .

4.4.2. GENOTIPADO DE CYP2E1

4.4.2.1. Genotipado de CYP2E1 alelo 5B (CYP2E1*5B)

Se realiza la lectura de la electroforesis después de seguir las condiciones descritas en el apartado de material y métodos de los tres patrones posibles que corresponden a los tres genotipos analizados para CYP2E1*5B. Los resultados obtenidos se muestran en la imagen siguiente.

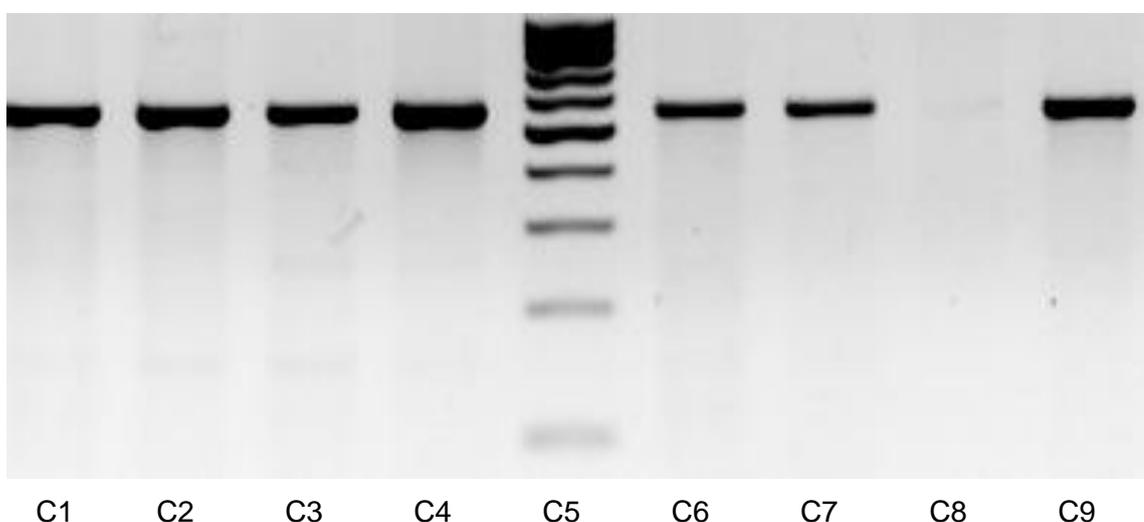


Figura 17. Imagen de productos de amplificación CYP2E1*5B de una serie de muestras

Calles 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9	Amplificación positiva
Calle 5	Control de pesos moleculares (Ladder) 100 bp
Calle 8	Amplificación débil, no válida para la digestión

Los resultados de someter los productos de PCR a la digestión con PstI, se muestran en la imagen correspondiente a la figura 18.

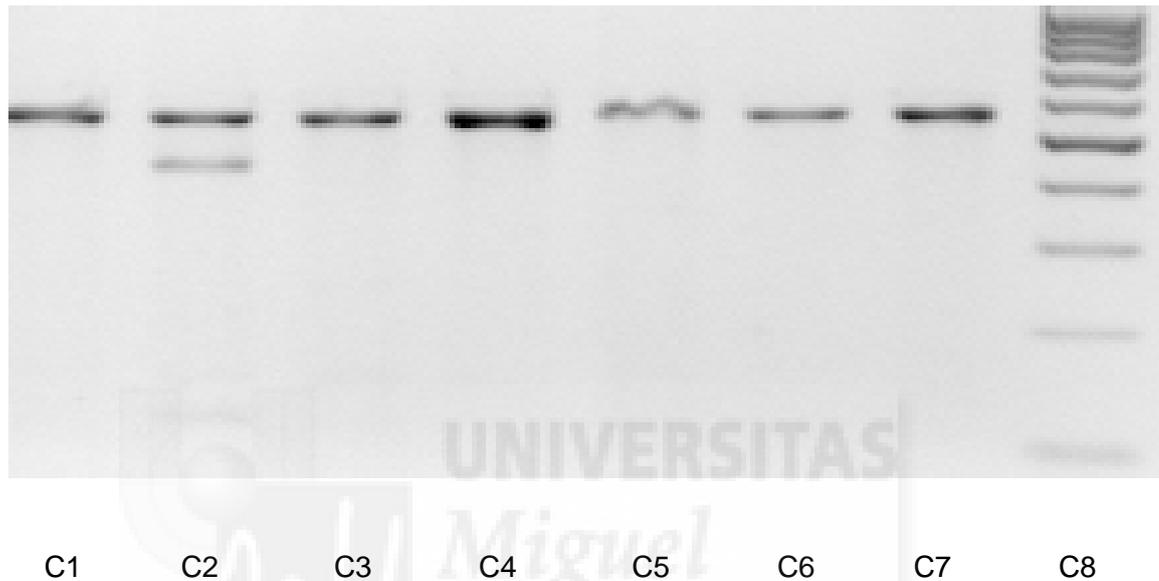


Figura 18. Resultados de los productos de PCR sometidos a la digestión con PstI

Calle 2: Heterocigotos c1/c2

Calles 1,3,4,5,6,7: homocigotos wild type c1/c1

Calle 8: Control de pesos moleculares 100 bp

4.4.2.2. Genotipado del gen CYP2E1 alelo 6 (CYP2E1*6)

Los resultados de la reacción de amplificación, siguiendo las concentraciones descritas en el apartado de material y métodos, se muestran en la siguiente imagen.

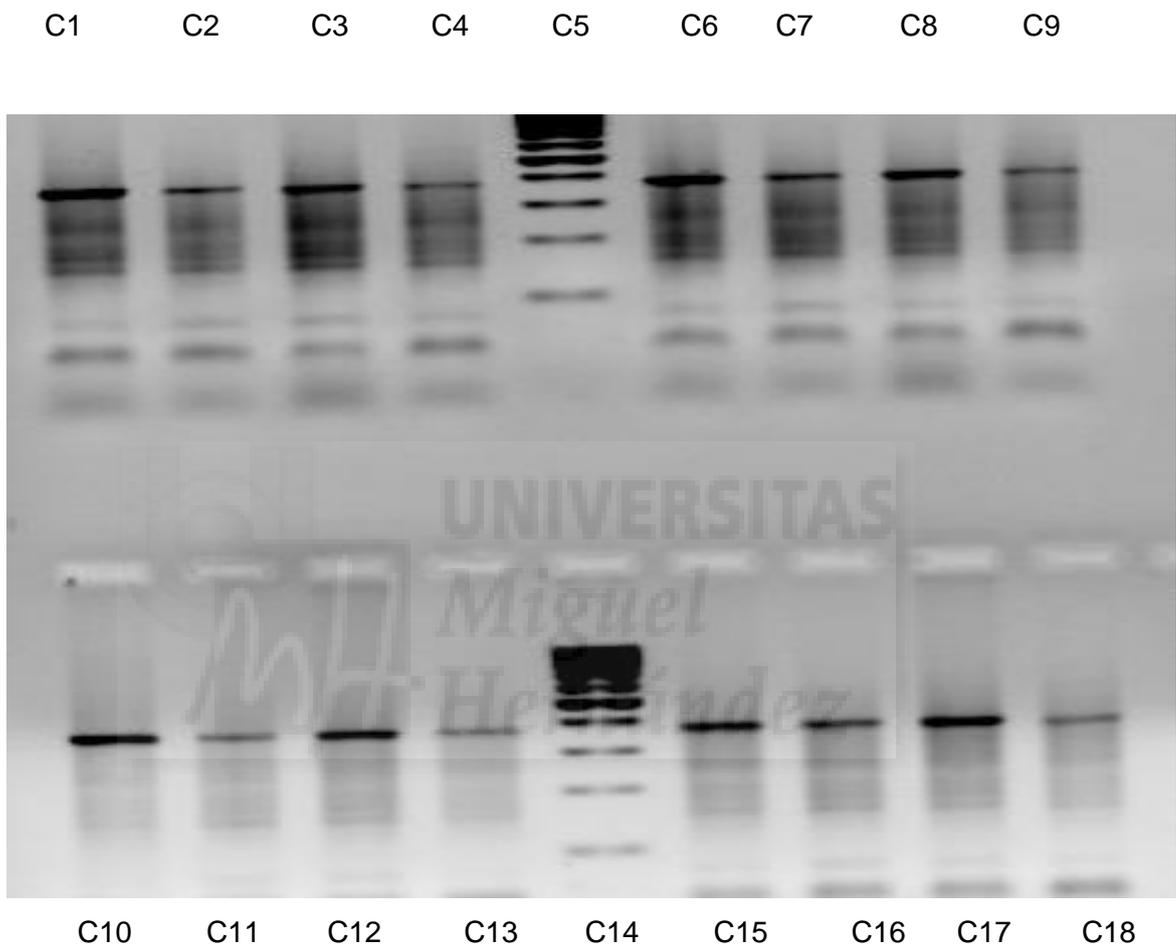


Figura 19. Amplificación Intron 6 de CYP2E1 banda 373 bp

Las calles superiores de la imagen contienen master mix sin DMSO e inferiores con DMSO.

Calles 5 y 14: control de pesos moleculares.

Calles 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,17,18: amplificación positiva (373 bp).

Un volumen variable de producto amplificado según la intensidad de las bandas obtenidas (entre 10-15 ul) se sometió a la acción de la enzima de restricción DraI en las concentraciones y condiciones descritas en el cuadro de material y métodos. Los resultados del genotipo se muestran en la siguiente imagen

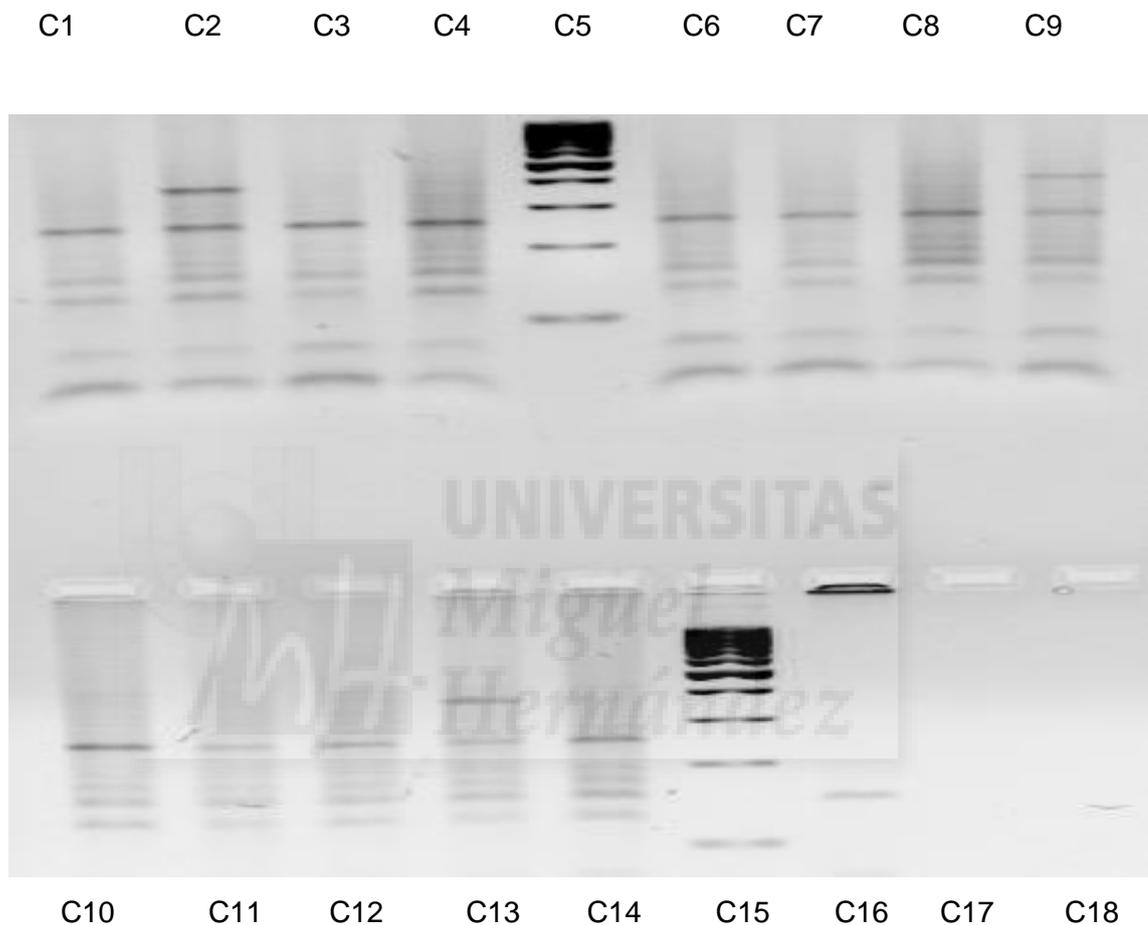


Figura 20. IM 4132 Digestiones CYP2E1 Intron 6 DraI

Calles 2,9 y13: Heterocigotos DC

Calles 5 y 15: Control de pesos moleculares 100 bp

Calles 1,3,4,6,7,8,10,11,12,14: Homocigotos Wt DD

Calles 16,17,18: Digestiones débiles, no válidas

4.4.3. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO NULO DEL GEN GSTM1

En la siguiente imagen se muestran ejemplos de resultados obtenidos tras correr varias muestras de geles de agarosa y leer los resultados tras someterlos a exposición con luz ultravioleta en transiluminador, de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado de material y métodos.

Los resultados se interpretan como presencia (dos bandas a 215 bp y 350 bp correspondientes a los genes GSTM1 y albúmina respectivamente) o ausencia del gen (una sola banda a 350 bp correspondiente a la albúmina).

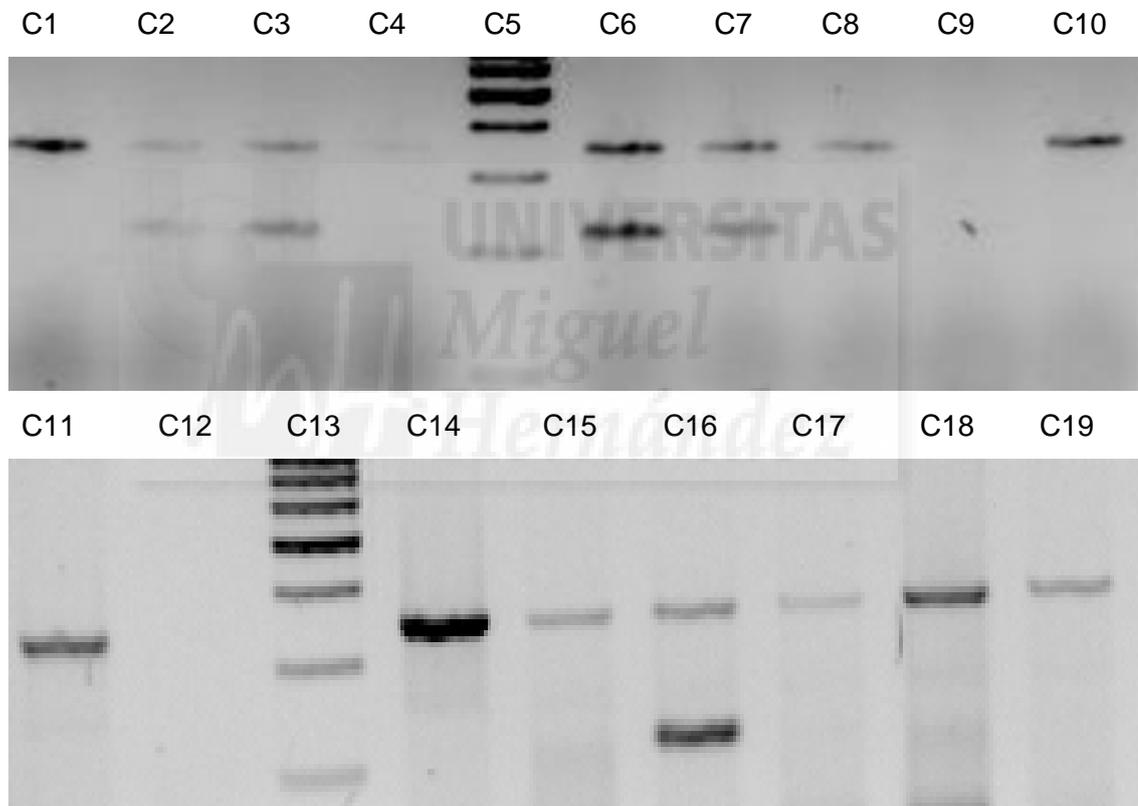


Figura 21. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTM1.

Calles 1 4, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18,19: polimorfismo nulo (ausencia del gen)

Calles 2, 3, 6, 7,16: Presencia del gen GSTM1

Calles 9,12: No amplificación de las muestras de mucosa yugal

Calles 5,13: Control pesos moleculares 100 bp. Banda más intensa 500 bp

Los patrones de bandas obtenidos corresponden a los genotipos descritos a continuación. Los tamaños de los amplificados en el análisis de los polimorfismos nulos en GSTM1 son los siguientes:

NOMENCLATURA GENOTIPOS	GENOTIPOS	PATRON BANDAS
GSTM1*1	++	215 bp y 350 bp
GSTM1*0	nulo	350 bp
Control albúmina		350 bp

4.4.4. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO NULO DEL GEN GSTT1

En la siguiente figura se muestran ejemplos de resultados obtenidos tras correr las muestras en geles de agarosa y leer los resultados tras someter los geles a exposición con luz UV en transiluminador, de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado de material y métodos.

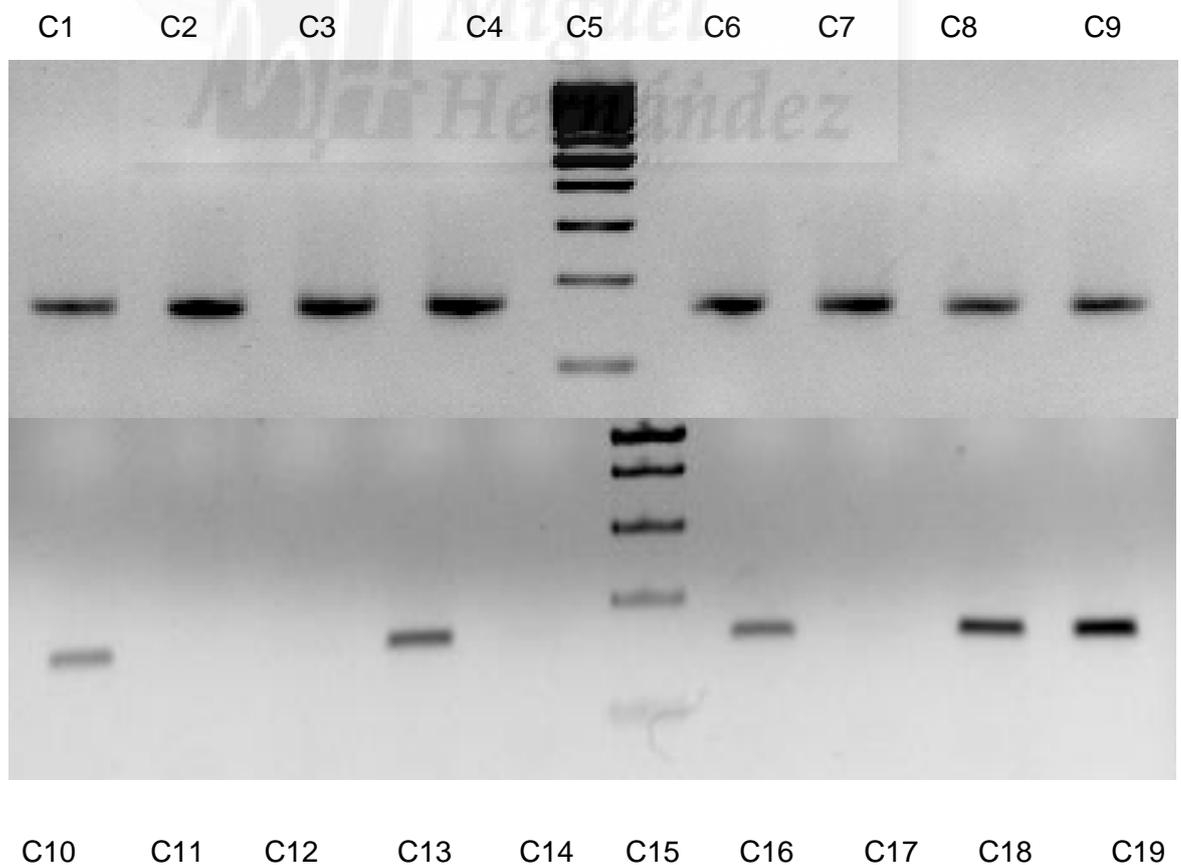


Figura 22. Genotipado del polimorfismo nulo del gen GSTT1

Calles 5 y 15: control de pesos moleculares 100 bp

Calles 1,2,3,4,6,7,8,9, 13,16,18,19 Positivos. Presencia del gen GSTT1

Calles 12, 14,17. Negativos. GSTT1 nulo

Calle 10. Contro, positivo

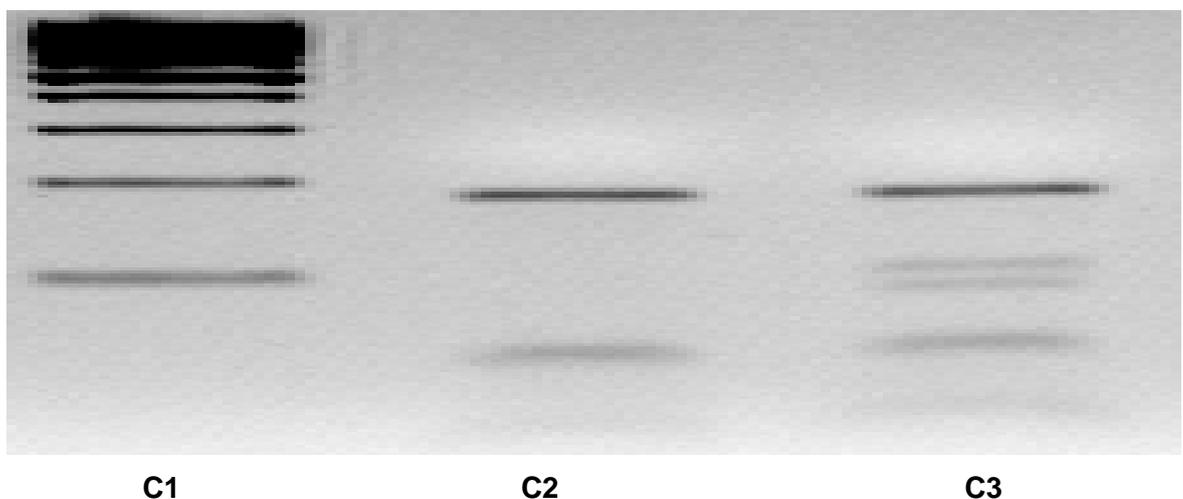
Calle 11, control negativo (Master mix sin DNA)

Los patrones de bandas obtenidos corresponden a los genotipos descritos a continuación.

NOMENCLATURA GENOTIPOS	GENOTIPOS	PATRON BANDAS
GSTT1*1	++	160 bp
GSTT1*0	nulo	NO BANDAS
Control positivo muestra control		160 bp

4.4.5. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO RS1695 Ile105val DEL GEN GSTP1

En la siguiente figura se muestran ejemplos de resultados obtenidos tras correr las muestras en geles de agarosa y leer los resultados tras someter los geles a exposición con luz UV en transiluminador, de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado de material y métodos.



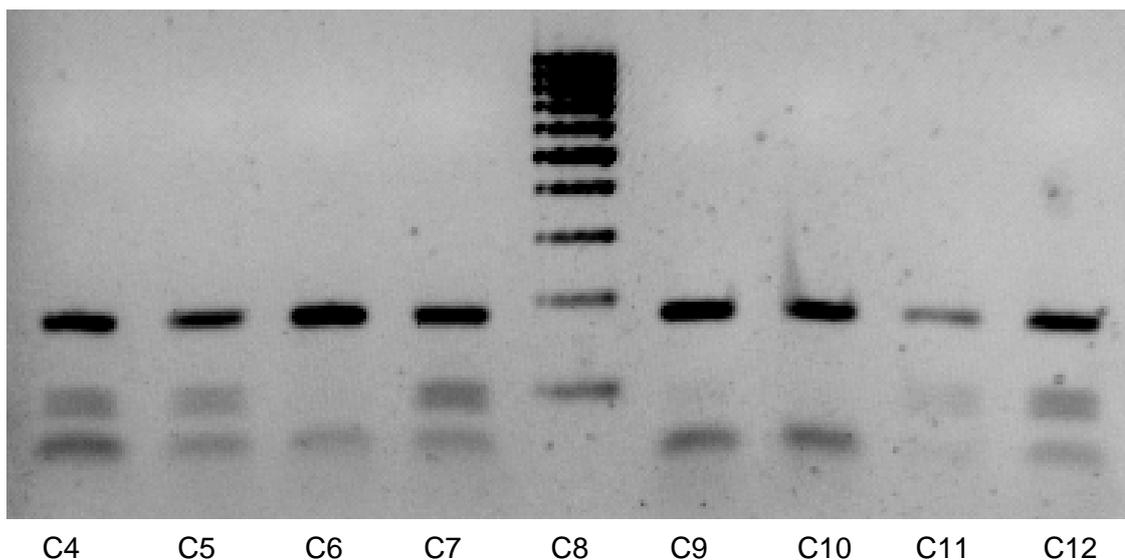


Figura 23. Genotipado del polimorfismo RS1695 Ile105val del gen GSTP1. Resultado de los productos sometidos a digestión

Calles 1 y 8: control de pesos moleculares

Calles 2, 6, 9, 10: homocigoto AA wild type (Ile/Ile) 176bp

Calles 3, 4, 5, 7, 11,12: heterocigoto GA (Ile/Val) 176 bp + 91bp + 85 bp

4.4.6. RESULTADOS DEL GENOTIPADO DE LOS GENES CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 EN LAS MUESTRAS MUCOSA YUGAL DE TRABAJADORES EXPUESTOS Y CONTROLES

En la siguiente tabla se muestra el resumen del genotipado de los genes analizados de CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 en trabajadores expuestos y controles una vez analizadas todas las muestras. Se han calculado las frecuencias de los genotipos en controles, expuestos y en el total de la muestras comparándolas con las descritas en otros estudios.

Tabla 32. Resultados del genotipado de los genes CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, en las muestras de mucosa bucal recogidas. Frecuencias de los genotipos obtenidos en expuestos y controles.

GEN	GENOTIPOS	Frecuencias Controles	Frecuencias expuestos	Frecuencias exp+controles
GSTM1	GSTM1*1Wt	54,4%	51,7%	52,5%
	GSTM1+0 (nulo)	45,6%	48,3%	47,5%
GSTT1	GSTT1*1 Wt	78,3%	80,7%	79,9%
	GSTT1*0 (nulo)	21,7%	19,3%	20,1%
GSTP1 RS 1695 Ile105val	AA Ile/Ile	35%	48,6%	43,9%
	GG Val/Val	2,5%	1,4%	1,8%
	AG Ile/Val	62,5%	50%	54,4%
CYP2E1*6				
DD-TT Wt	TT	83,1%	80,0%	81,1%
DC-TA Hetero	TA	15,7%	19,3%	18,0%
CC-AA Homo	AA	1,2%	0,7%	0,9%
CYP2E1*5B				
c1/c1 Wt	NC c1/c1	93,8%	92,6%	93,0%
c1/c2	Hetero c1/c2	6,2%	7,4%	5,9%
c2/c2	Homo c2/c2	0%	0%	0%

4.5. RESULTADOS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 EN LAS MUESTRAS DE SANGRE ANALIZADAS

En la tabla 33 se resumen los resultados obtenidos de la cuantificación a tiempo real del mRNA de la CYP2E1, la GSTM1, GSTT1 y GSTP1 mediante PCR en muestras de sangre total, tras la aplicación del método comparativo de Ct correspondientes a las muestras analizadas.

Tabla 33. Parámetros estadísticos relativos a la cuantificación del RNAm según el método comparativo de Ct en las muestras de sangre analizadas de los trabajadores (expuestos y controles)

	Mínimo	Máximo	Media	DS
NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) CYP2E1	0,002	94,63	5,20	13,94
NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) GSTM1	0,002	706,722	17,20	62,99
NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) GSTT1	0,002	70,522	4,64	11,03
NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) GSTP1	1,879	9574,623	384,06	878,31

NEcalibrador indica el nivel de expresión del gen en la muestra relativa al calibrador, considerando como calibrador el control con menor expresión.

Existen grandes diferencias entre los niveles de expresión de los tres miembros de la familia de las GSTs siendo Siendo muy elevado en el caso de GSTP1 y muy bajo en el de la GSTT1.

El estudio comparativo de los niveles de expresión de los genes entre trabajadores expuestos y controles en función de la exposición, se muestra en la tabla 34.

Tabla 34. Niveles de expresión del mRNA de las enzimas en sangre de trabajadores expuestos y no expuestos.

		Media	DS	t(p)
NEcalibrador (CYP2E1)	Expuestos	6,58	16,25	2,49 (p<0.05)
	Controles	2,61	7,47	
NEcalibrador (GSTM1)	Expuestos	20,17	73,92	n.s.
	Controles	11,58	33,61	
NEcalibrador (GSTT1))	Expuestos	3,21	6,55	n.s.
	Controles	7,65	16,64	
NEcalibrador (GSTP1))	Expuestos	489,97	1054,66	3,46 (p<0.005)
	Controles	173,93	182,59	

n s.: no significativo

Los resultados muestran un mayor nivel de expresión de la CYP2E1 y de la GSTP1 en el grupo de trabajadores expuestos con respecto a los controles. En trabajadores expuestos ambos genes se expresan casi 3 veces más que en controles, Para la GSTM1 y GSTT1 las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

4.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MICRONUCLEOS EN LAS MUESTRAS DE TRABAJADORES EXPUESTOS Y CONTROLES

Siguiendo el método especificado anteriormente se ha realizado el análisis de los MN en las muestras procedentes de los trabajadores expuestos y de los controles. El resultado obtenido en expuestos respecto a la tasa de MN por 1000 células binucleadas, es de media 6,71 micronúcleos/1000 células (rango de 0 a 32), más alta que en controles que es de 3,4 micronúcleos/1000 células (rango de 1 a 8). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($t=4,063$, $p<0,001$) (figura 24). Dentro del grupo de expuestos un 11% de los trabajadores tienen 10 o más MN, tasa que no se supera en ningún caso en el grupo control, con un valor máximo de 8 MN/1000 células.

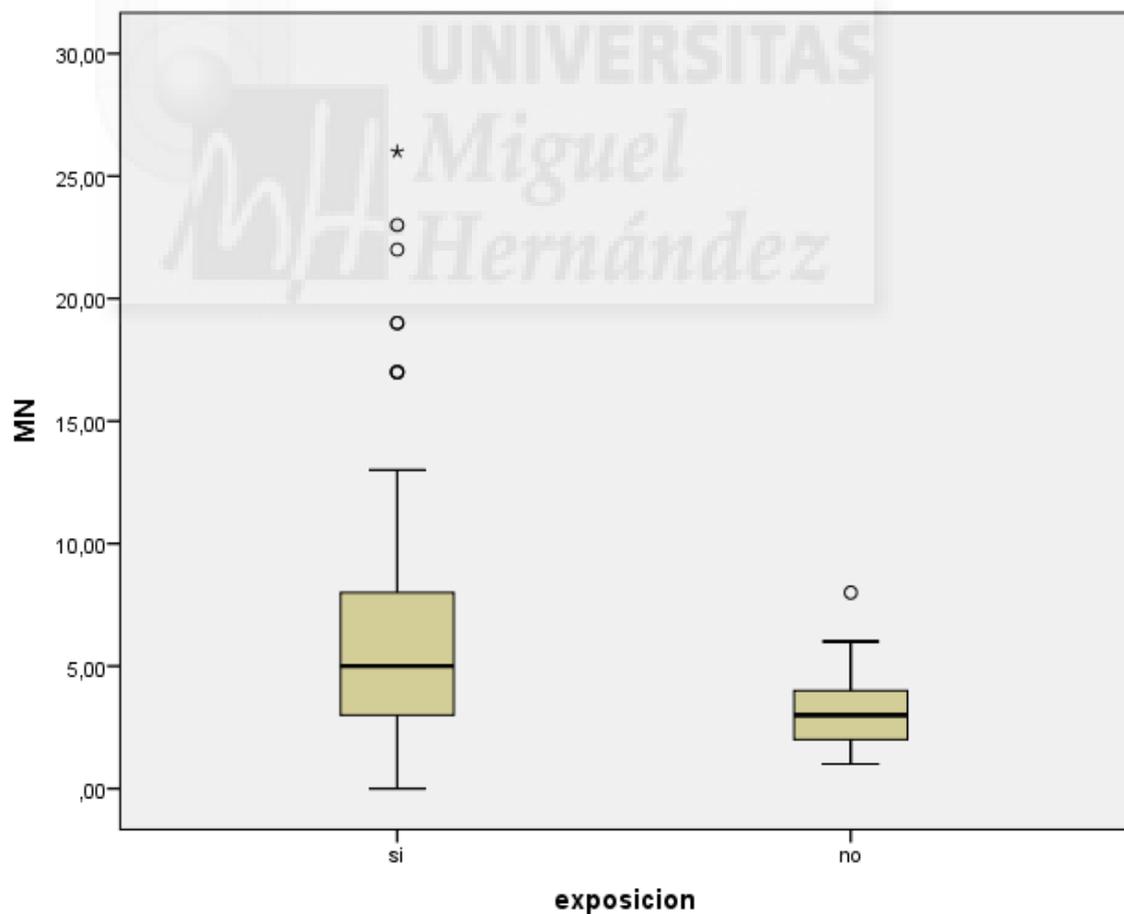


Figura 24. Tasa media de Micronúcleos (MN/1000 CBN) en expuestos y controles

4.7. RESULTADOS DE LAS RELACIONES DE LOS INDICADORES BIOLÓGICOS CON LAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTES EN EL AMBIENTE. VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES OCUPACIONALES Y EXTRAOCUPACIONALES EN LOS NIVELES DE LOS INDICADORES BIOLÓGICO

4.7.1. RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES AMBIENTALES DE TOLUENO, XILENO Y N-HEXANO Y LOS INDICADORES BIOLÓGICOS EN ORINA.

En el estudio de la relación entre las concentraciones ambientales de los disolventes detectados en ambiente y las concentraciones urinarias de sus respectivos indicadores biológicos analizados en orina no se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas debido fundamentalmente a que en algunas empresas no se realizó una medición individual de cada trabajador sino que se hizo de forma general para varios puestos o en un puesto representativo de la exposición estimada en un grupo de trabajadores (normalmente un puesto de cada 10), como suele realizarse habitualmente en la práctica de la evaluación higiénica de los puestos de trabajo con grupos homogéneos de exposición. En otras empresas la recogida de las muestras de orina de final de turno tampoco coincidió con la jornada en la que se realizó la toma de muestras ambientales, por problemas logísticos.

Si que hemos encontrado correlaciones significativas y de signo positivo entre los metabolitos de los disolventes mayoritarios: el ácido hipúrico, metabolito del tolueno, con las concentraciones de 2,5-hexanodiona libre y total, indicadores biológicos del n-hexano, así como también entre la 2,5-hexanodiona libre y la total, como muestra la matriz de correlación de la tabla 35.

Tabla 35. Correlaciones obtenidas entre los diferentes indicadores biológicos analizados en orina

	Acido hipúrico (g/g creat)	2,5-hexanodiona libre (mg/l)	2,5-hexanodiona total (mg/l)
Acido hipúrico (g/g creat)	1,000 .	R=0,307 P<0 ,001	R=0,309 P<0 ,001
2,5-hexanodiona libre (mg/l)	R=0,307 P<0 ,001	1,000 .	R=0,542 P<0 ,001
2,5-hexanodiona total (mg/l)	R=0,309 P<0 ,001	R=0,542 P<0 ,001	1,000 .

4.7.2. INFLUENCIA DE FACTORES OCUPACIONALES Y EXTRA OCUPACIONALES EN LOS NIVELES DE LOS INDICADORES BIOLÓGICOS

El estudio de la influencia de las distintas variables recogidas en la historia clínico-laboral en las concentraciones urinarias de los indicadores biológicos analizados muestra algunas relaciones estadísticamente significativas, que se exponen en las siguientes tablas con los niveles de significación.

En cuanto a las horas de exposición hemos encontrado relaciones significativas de las concentraciones de ácido hipúrico y de 2,5-hexanodiona libre y total en orina con las horas de trabajo semanales (tabla 36); los trabajadores expuestos a los disolventes durante más de 40 horas semanales presentan niveles de indicadores biológicos en orina significativamente superiores a aquellos expuestos durante jornadas estándares de 40 horas semanales o jornadas de menor duración

Tabla 36. Niveles medios de los indicadores biológicos urinarios en función de las horas de exposición

	Horas/semana	Media	Desviación tip.	T (p)
Ácido Hipúrico (g/g creatinina)	40 o menos	0,76	0,60	-2,26 p<0,05
	mas de 40	1,27	2,11	
2,5-hexanodiona total (mg/l)	40 o menos	0,63	0,82	-1,81 p<0,05
	mas de 40	1,09	1,58	
2,5-hexanodiona libre (mg/l)	40 o menos	0,08	0,11	n.s.
	Mas de 40	0,10	0,25	

n.s.: no significativo

En relación a los hábitos higiénicos y medidas de protección personal seguidas por el trabajador hemos encontrado, que aquellos trabajadores que no utilizan guantes como equipos de protección individual a la hora de aplicar el adhesivo o manipular los disolventes presentan mayores niveles de los indicadores biológicos en orina (Tabla 37). Aunque las diferencias no llegan a ser significativas ponen de manifiesto la importancia de la absorción via dérmica de los disolventes orgánicos, así como la necesidad de utilizar guantes y ropas de protección para evitar esta absorción. También hemos encontrado mayores niveles de ácido hipúrico en aquellos trabajadores que refieren ingerir alimentos en el puesto de trabajo (tabla 38), poniendo de manifiesto la importancia también de la absorción por vía digestiva cuando no se siguen hábitos higiénicos correctos y no se dispone de locales separados del puesto para

almorzar, como ocurre en la mayoría de las empresas muestreadas en nuestro estudio.

Tabla 37. Niveles medios de los indicadores biológicos urinarios en función del uso de guantes

	Uso de guantes	Media	Desviación típ.	UMann-W (p)
Ácido hipúrico (g/g creatinina)	Si	1,03	0,93	n.s.
	No	1,25	2,12	
2,5-hexanodiona total (mg/l)	Si	0,92	1,14	n.s.
	No	0,97	1,51	
2,5-hexanodiona libre (mg/l)	Si	0,07	0,11	1330 (0,05)
	No	0,11	0,25	

n.s.: no significativo

Tabla 38. Niveles medios de ácido hipúrico encontrados en la orina de trabajadores expuestos en función de si almuerzan o no en el puesto de trabajo

	Ingiera alimentos en el trabajo	Media	Desviación típ.	UMann-W (p)
Ácido hipúrico (g/g creatinina)	Si	1,29	1,95	1161 P<0,05
	No	0,80	0,54	

En el estudio de la relación entre la excreción de los indicadores urinarios analizados y los hábitos tóxicos recogidos en la historia clínica, hemos encontrado unas concentraciones mayores de hexanodiona libre y total y unas concentraciones menores de los metabolitos mayoritarios del tolueno y xilenos, los ácidos hipúrico y metilhipúricos, en sujetos que refieren consumir alcohol diariamente, no obstante las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La misma tendencia encontramos con respecto al hábito

tabáquico. Con la toma de medicamentos la tendencia es a una menor excreción de los metabolitos en trabajadores, que en el momento de la toma de muestra, refieren tomar algún tipo de medicamento, que podría explicarse por una competencia por los sistemas oxidantes, no obstante las diferencias tampoco resultaron significativas.

4.8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES RECOGIDAS EN LA HISTORIA CLÍNICO-LABORAL, EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS

Dado que, según viene reflejado en la literatura, los niveles de las enzimas pueden alterarse por exposición a otros tóxicos, hemos estudiado la influencia de los hábitos tóxicos recogidos en la historia clínica (consumo de tabaco y alcohol) sobre la expresión del mRNA en sangre de las diferentes enzimas estudiadas. Encontramos mayores niveles de expresión de CYP2E1 y GSTM1 y menores niveles de expresión de GSTT1 y GSTP1 en sujetos que refieren consumir alcohol diariamente y en fumadores, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Los niveles de expresión de las enzimas no mostraron correlación con los niveles ambientales de los disolventes ni con concentraciones urinarias de los indicadores biológicos analizados. No obstante la expresión del mRNA de CYP2E1 disminuyó significativamente al aumentar los años de exposición ($r=-2,02$, $p<0,01$).

4.8.1. RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPADO Y FENOTIPADO DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS

El estudio de la relación entre los genotipos de los alelos estudiados y el nivel de expresión de las correspondientes enzimas medido mediante la cuantificación del mRNA por RT-PCR no muestra resultados estadísticamente significativos para ninguna de las enzimas estudiadas. Los resultados aquí

presentados, aunque muestran un nivel de expresión frente al calibrador (NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en individuos heterocigotos (c1/c2) de aproximadamente la mitad que en homocigotos silvestres (c1/c1), las diferencias no fueron estadísticamente significativas, al igual que ocurre también para el heterocigoto (TA) y homocigoto (AA) el alelo CYP2E1*6 con respecto al homocigoto silvestre (TT) (tabla 39).

Tabla 39. Niveles de expresión de los genes estudiados medidos mediante la cuantificación del mRNA en sangre en relación al genotipo.

NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		Media	DS	t(p)
CYP2E1*5B (Pst1)	Heterocigoto (c1/c2)	2,75	0,04950	n.s.
	Silvestre (c1/c1)	4,99	13,44	
CYP2E1*6 (Dra)	Homocigoto (AA)	0,19	0,13	n.s.
	Heterocigoto (TA)	3,82	9,16	
	Silvestre (TT)	4,99	13,61	
GSTM1	GSTM1*1 (presente)	21,68	47,53	n.s.
	GSTM1*0 (delección)	11,74	76,84	
GSTT1	GSTT1*1 (presente)	3,98	6,86	n.s.
	GSTT1*0 (delección)	2,01	10,86	
GSTP1	AA (Ile/Ile) 313	352,39	573,67	n.s.
	AG (Ile/Val) 313	402,20	1062,50	
	GG (Val/Val) 313	142,82	123,56	

n.s.: no significativo

Con respecto a los polimorfismos estudiados de las GSTs (GSTM1, GSTT1 y GSTP1), en el estudio de la relación entre el genotipo y su expresión fenotípica los resultados tampoco son estadísticamente significativos (tabla 39) pero muestran un menor nivel de expresión de los genes GSTM1 y GSTT1 en individuos nulos (alelolelo deleciónado) con respecto a los individuos portadores del gen, e igualmente una disminución en el nivel de expresión del gen GSTP1 en presencia de la variante Ile/Val y Val/Val en el exón 5, provocada por la transición A → G en el nucleótido 313 (codón 104) . Si consideramos sólo el grupo de las mujeres sí que encontramos diferencias significativas entre individuos nulos y no nulos en los niveles de expresión de GSTM1 y GSTT1 ($t=2,26$ $p<0,05$ y $t=4,48$, $p<0,001$), así como también para la enzima GSTT1 en el grupo de expuestos ($t=5,04$, $p<0,001$) (figura 25)

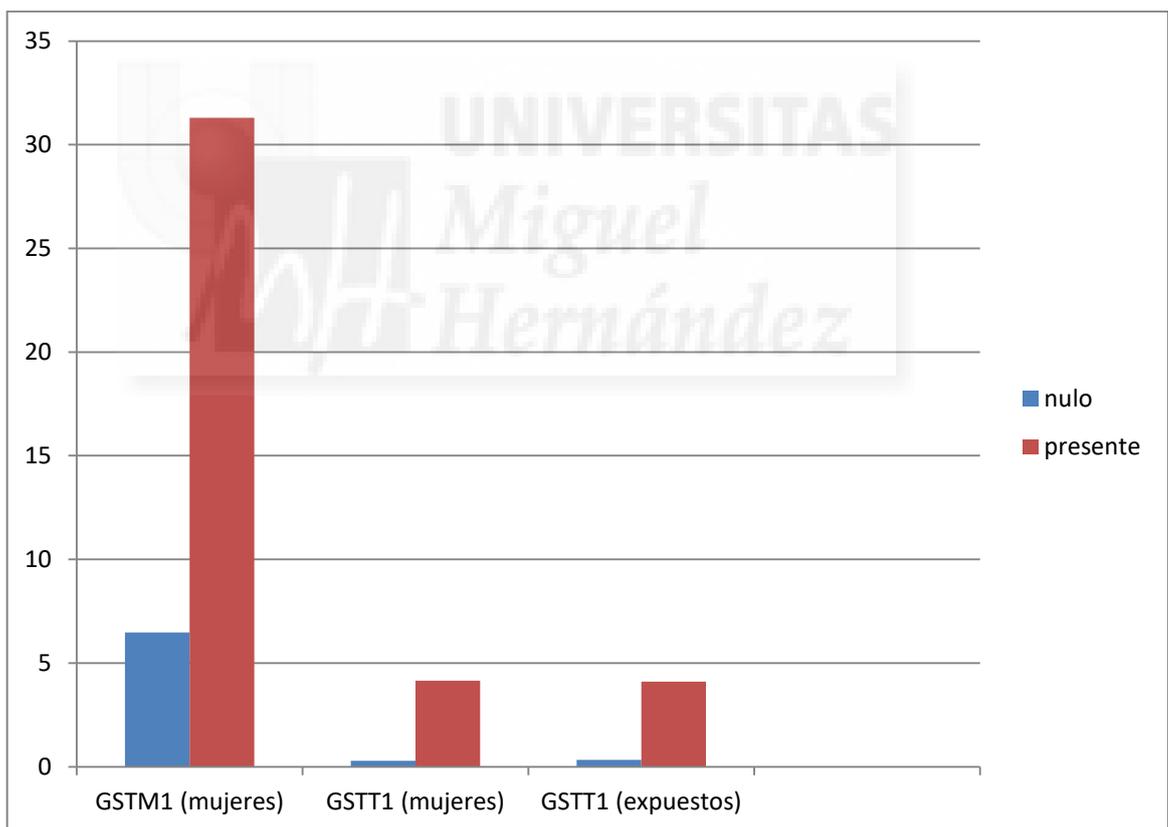


Figura 25. Niveles medios de expresión de los genes GSTM1/GSTT1 medidos mediante la cuantificación del mRNA en sangre NEcalibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en relación al genotipo, en el grupo de mujeres y trabajadores expuestos

4.8.2. RELACIONES ENTRE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS CON LOS NIVELES DE INDICADORES BIOLÓGICOS

El análisis de la influencia del genotipo de los alelos estudiados sobre los niveles de los indicadores biológicos analizados en orina muestra una disminución en la excreción de los metabolitos mayoritarios del tolueno y xileno (ácidos hipúrico y metilhipúricos) así como de 2,5-hexanodiona (total y libre), metabolitos del n-hexano, en individuos portadores del alelo variante heterocigotos (c1/c2) del gen CYP2E1*5B con respecto a los homocigotos silvestres (c1/c1) (tabla 40). Aunque los resultados no llegan a tener significación estadística, concuerdan con los presentados en el apartado anterior (Tabla 39) que muestran en individuos heterocigotos un nivel significativamente menor en la expresión de la enzima. Una tendencia similar, aunque tampoco significativa, fue observada para el alelo CYP2E1*6 en individuos portadores del alelo heterocigoto TA en comparación con el homocigoto silvestre TT (resultados no mostrados).

Tabla 40. Influencia del genotipo en la excreción urinaria de los indicadores biológicos analizados

	Gen	Genotipo	Media	DS	T(p)
Acido hipúrico (g/g creatinina)	CYP2E1*5B	Heterocigoto (c1/c2)	0,740	0,47	n.s.
		Silvestre (c1/c1)	0,915	1,37	
Acidos metilhipúricos (g/g creatinina)	CYP2E1*5B	Heterocigoto (c1/c2)	0,098	0,135	n.s.
		Silvestre (c1/c1)	0,142	0,141	
2,5-hexanodiona total (mg/l)	CYP2E1*5B	Heterocigoto (c1/c2)	0,41	0,323	n.s.
		Silvestre (c1/c1)	0,93	1,330	
2,5-hexanodiona libre (mg/l)	CYP2E1*5B	Heterocigoto (c1/c2)	0,05	0,06	n.s.
		Silvestre (c1/c1)	0,09	0,19	
2,5-hexanodiona libre (mg/l)	GSTM1	presente	0,12	0,24	T=2,27 P<0,05
		nulo	0,05	0,08	

n.s.: no significativo

Para el grupo de la GST, los resultados fueron significativos para la 2,5-hexanodiona libre con respecto a la GSTM1, encontrando una disminución estadísticamente significativa en la excreción de este metabolito en individuos con el genotipo nulo de la GSTM1 con respecto a los individuos no nulos, portadores del gen GSTM1 (tabla 40). Estos resultados concuerdan también con resultados presentados en apartado anterior que muestran en individuos portadores del polimorfismo nulo un nivel menor en la expresión del enzima (tabla 39). Para los genes GSTT1 y GSTP1 el análisis de la influencia del genotipo sobre los niveles de los diferentes indicadores biológicos analizados, muestra la misma tendencia de la tabla 39 pero en ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas.

4.8.3. RELACION ENTRE LOS POLIMORFISMOS DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS Y LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS (CBMN)

Dada la tasa de MN por 1.000 células binucleadas encontrada en la muestra de trabajadores expuestos de media 6,71 micronúcleos/1000 células (rango de 0 a 32), frente a 3,4 micronúcleos/1000 células (rango de 1 a 8) y en la que el 11% de los trabajadores expuestos presenta 10 o más MN (Figura 24) hemos pretendido evaluar si los polimorfismos de las enzimas estudiadas modifican la susceptibilidad individual al posible efecto citogenético de los disolventes medido con la frecuencia de MN. Aunque todas las variaciones de los genes estudiados (heterocigotos y homocigotos de corte de CYP2E1 y GSTP1 e individuos nulos de GSTM1 y GSTT1) presentaron mayores frecuencias de MN (tabla 41), en ningún caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, incluso después de controlar el efecto del tabaco, y de estudiar el efecto en expuestos y controles por separado.

Tabla 41. Tasa de MN/1000 CBN en función del genotipo de los genes estudiados para el total de la muestra (expuestos y controles).

MN /1000 CBM		Media	DS	t(p)
CYP2E1*5B (Pst1)	Heterocigoto (c1/c2)	7,33	6,59	n.s.
	Silvestre (c1/c1)	5,96	5,86	
CYP2E1*6 (Dra)	Heterocigoto (TA)	7,55	8,01	n.s.
	Silvestre (TT)	5,68	5,09	
GSTM1	GSTM1*1 (presente)	5,89	5,59	n.s.
	GSTM1*0 (delección)	6,16	6,14	
GSTT1	GSTT1*1 (presente)	5,93	5,95	n.s.
	GSTT1*0 (delección)	6,61	5,63	
GSTP1	AA (Ile/Ile) 313	5,11	2,94	n.s.
	AG (Ile/Val) 313	6,73	7,48	
	GG (Val/Val) 313	8,00	4,24	

n.s.: no significativo

4.8.4. RELACION ENTRE LA TASA DE MICRONÚCLEOS (CBMN) Y LAS VARIABLES RECOGIDAS EN LA HISTORIA HIGIENICO CLÍNICA

La tasa de MN no mostró correlación con los niveles ambientales de los disolventes detectadas en el puesto de trabajo, pero sí con las concentraciones urinarias de ácido hipúrico ($r=0,240$, $p<0,05$) y con la edad ($r=0,269$, $p<0,01$). También mostró diferencias en función del sexo, siendo significativamente mayor en mujeres $7,17 \pm 6,46$ MN (0-32) que en hombres $4,61 \pm 4,43$ MN (0-23) (figura 26), ($t=-2,14$, $p<0,05$).

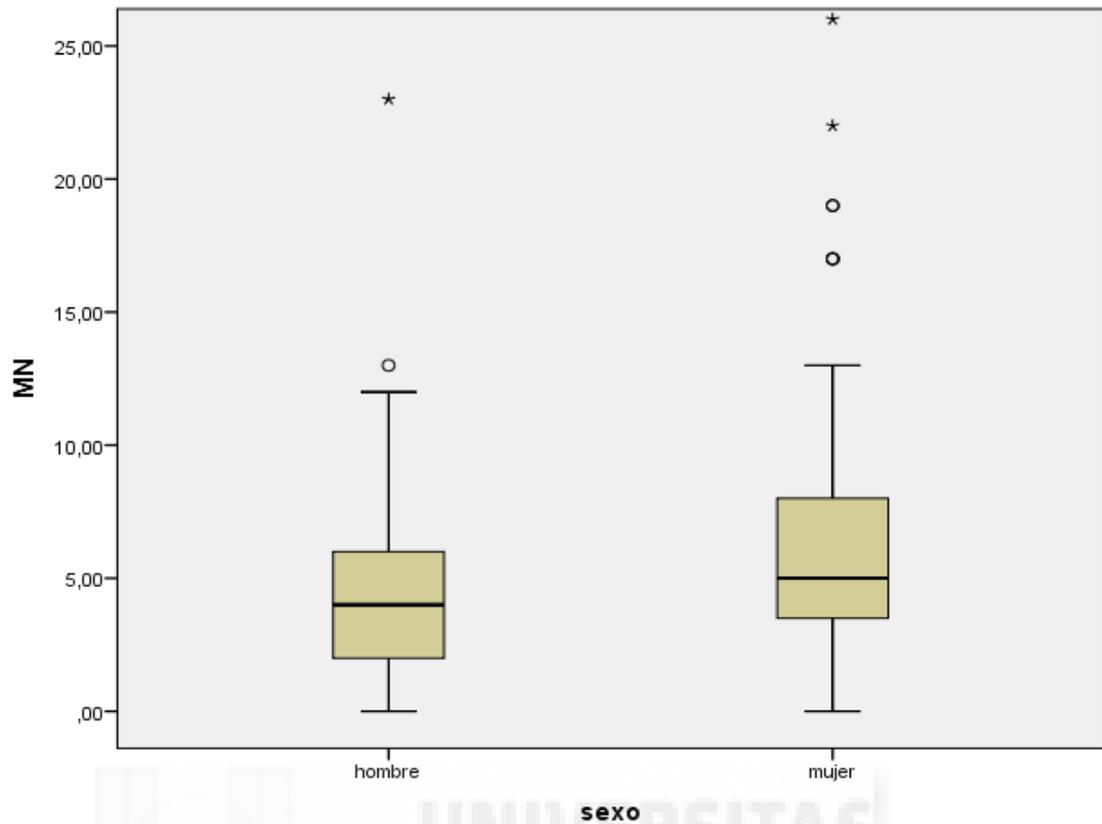


Figura 26. Tasa media de Micronucleos (MN/1000 CBN) en hombres y mujeres

En cuanto a las variables recogidas en la historia clínico-laboral, la tasa de micronucleos no mostró relación con la antigüedad en el puesto de trabajo pero sí con el tiempo de exposición medido en horas de trabajo semanales, revelando una tasa media de MN significativamente mayor en sujetos que superan la jornada estándar de 40 horas semanales (tabla 42). En relación a los hábitos higiénicos, la tasa también fue significativamente mayor en individuos que no utilizan mascarilla durante la manipulación de disolventes y aplicación de las colas (tabla 42) Y con respecto a los hábitos tóxicos, no obtuvimos relación con el consumo de alcohol y tabaco, pero sí con el de medicamentos (tabla 42).

Tabla 42. Tasa de MN/1000 CBN en función de diferentes variables de la historia laboral

MN /1000 CBM	VARIABLES	Media	DS	t(p)
Horas / semana	menos o igual a 40 h	5,2154	5,29591	-2,319 (p<0,05)
	mas de 40 h	8,3793	6,43880	
Uso de mascarilla	No	6,7250	4,61318	1,966 (p=0,05)
	Si	4,1053	5,13046	
Consumo de medicamentos	Si	7,5897	7,01771	2,08 (p<0,05)
	No	5,1071	4,63457	

4.8.5. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES RECOGIDAS EN LA HISTORIA CLÍNICA Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS

Dado que, según viene reflejado en la literatura, los niveles de las enzimas pueden alterarse por exposición a otros tóxicos, hemos estudiado la influencia de los hábitos tóxicos recogidos en la historia clínica (consumo de tabaco y alcohol) sobre la expresión del mRNA en sangre de las diferentes enzimas estudiadas. Encontramos mayores niveles de expresión de CYP2E1 y GSTM1 y menores niveles de expresión de GSTT1 y GSTP1 en sujetos que refieren consumir alcohol diariamente y en fumadores, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Los niveles de expresión de las enzimas no mostraron correlación con los niveles ambientales de los disolventes ni con concentraciones urinarias de los indicadores biológicos analizados. No obstante la expresión del mRNA de CYP2E1 disminuyó significativamente al aumentar los años de exposición ($r=-2,02$, $p<0,01$).

5. DISCUSIÓN



5.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL GRUPO DE TRABAJADORES. CONTROL HIGIENICO CLÍNICO, AMBIENTAL Y BIOLÓGICO.

Nuestro estudio se ha realizado sobre una muestra de 272 trabajadores: 167 trabajadores expuestos y 105 controles.

El grupo de expuestos está constituido por 67 hombres y 100 mujeres con una media de edad de 43,0 años (rango: 19–64 años) pertenecientes a 21 diferentes empresas de calzado ubicadas en la provincia de Alicante que utilizan disolventes dentro del proceso de producción (hexano, tolueno, acetona, heptano, isómeros de hexano, metiletilcetona, acetato de etilo, ciclohexano). La selección de los trabajadores expuestos se realiza en base al puesto de trabajo en donde llevan a cabo sus tareas según el plan de prevención de la empresa. Aunque existe un predominio de mujeres respecto de hombres en la muestra de estudio, no se ha llevado a cabo distinción de género, a diferencia de otras publicaciones en la bibliografía consultada que estudian solamente grupos homogéneos en cuanto al género, tal es el caso del trabajo realizado en empresas de calzado de Bulgaria donde solamente se estudian mujeres (Pitarque y cols., 1999), o los estudios realizados sobre trabajadores expuestos a Tolueno en imprentas en el que solamente se trabaja con hombres (Kawamoto y cols., 1995), (Mendoza-Cantú y cols., 2006), o el trabajo realizado por Testa y cols. (2005) en trabajadores de pinturas de coches expuestos a mezclas de disolvente orgánicos.

La mayor parte de los puestos de trabajo muestreados (48,5%) son de dar cola y de aparado (tabla 17 y figura 14). En estos puestos de trabajo, es donde mayor riesgo de inhalación de disolventes orgánicos existe, principalmente en las tareas de aplicación de adhesivos dentro del proceso de montaje, en la colocación de pegado de la plantilla inferior, en el proceso de pegado interior de los forros para que se fije el tope o contrafuerte y en el proceso de pegado de suelas, directamente sobre la mesa de trabajo.

El grupo de trabajadores no expuestos (controles) está constituido por 105 sujetos (41 hombres y 64 mujeres) con una media de edad de 45,6 años (rango: 24 -65 años) sin historia de exposición a agentes químicos. Este grupo de controles, ha sido elegido entre trabajadores de tareas administrativas que no tienen relación alguna con empresas que manejan disolventes orgánicos. Se ha considerado importante la utilización del grupo control para poder comparar los resultados entre personas expuestas y no expuestas aunque otros trabajos no utilizan este grupo control y solamente estudian trabajadores expuestos (Jiménez- Garza y cols., 2012); (Mendoza-Cantú y cols., 2006).

En lo referente a los resultados obtenidos en el pase de la encuesta (Anexo III), encontramos que, los trabajadores expuestos desarrollan su actividad laboral de lunes a viernes, con una media de 42,4 horas semanales de exposición a disolventes, (rango de 3 – 55 horas), ya que algunos operarios realizan rotación en diferentes tareas. Esto es importante tenerlo en cuenta desde el punto de vista preventivo, ya que a mayor tiempo de exposición, mayor será la absorción del tóxico por parte del trabajador. Además los valores límite biológicos (VLB) que se proponen como guía para la salud, vienen referidos a jornadas estándar de 8 horas diarias y 40 horas semanales de exposición (INSHT, 2016). La media de la antigüedad en el puesto de trabajo es de 10,4 años con un rango comprendido entre 4 meses y 40 años. El puesto de trabajo más frecuente entre los trabajadores expuestos, es el de dar cola con un 35,1%. Los demás puestos de trabajo (aparador, repasador, tintador...) se encuentran en proporciones menores al 20% (tabla 17).

En el cuestionario utilizado por los trabajadores expuestos, en que se les pregunta por la utilización o no de los diferentes sistemas de protección que la empresa pone a su alcance, se detecta que aproximadamente el 39% de los puestos de trabajo no disponen de un adecuado sistema de extracción localizada, la medida más eficaz para la reducción de la exposición a contaminantes, y que aproximadamente el 50% de los trabajadores no utiliza equipos de protección individual (EPIs) a la hora de aplicar las colas y manipular disolventes (tabla 26), tales como mascarillas y guantes. Ninguno de

los disolventes utilizados en los puestos de trabajo por si solos es considerado genotóxico pero utilizados simultáneamente podrían inducir una gran variedad de interacciones desconocidas. (Heuser y cols., 2007).

En referencia a los hábitos de higiene personal y, debido a que la jornada de trabajo es de más de 7 horas/día, los trabajadores realizan al menos una comida en la empresa. Esta comida se lleva a cabo normalmente en el mismo puesto de trabajo con el consiguiente riesgo de contaminación vía digestiva, puesto que solamente el 26% de los trabajadores declaran disponer de un local diferenciado para comer. Destacar que el 65% de los trabajadores refiere ingerir alimentos en el puesto de trabajo (tabla 27). Este dato puede contribuir a aumentar la exposición a disolventes orgánicos utilizando la vía digestiva además de la inhalatoria ya que está descrito en la bibliografía que existe posibilidad de contaminación por tolueno vía digestiva (Baelum y cols., 1993), que en referencia al xileno, la absorción gastrointestinal no está bien estudiada aunque se aportan datos de que se podría llegar a absorber el 34% del ingerido (Ogata, y cols., 1979) y que en lo referente al n-Hexano, aunque se sabe que existe absorción gastrointestinal, no existen datos en los que haya sido cuantificada (Baelum y cols., 1998); (Krasavage y cols., 1980).

En el cuestionario sobre los hábitos de higiene personal, se les pregunta también a los trabajadores expuestos si se cambian de ropa al comenzar el trabajo y si la ropa les cubre todo el cuerpo siendo el porcentaje afirmativo de 88,4% y 58,6%, respectivamente (tabla 27). Este dato puede resultar significativo para valorar el posible riesgo, puesto que existen publicaciones que han demostrado la absorción percutánea de los disolventes orgánicos aunque el grado de absorción no es tan grande como el que resulta de la inhalación. En los trabajos publicados para el m-xileno (Engstrom y cols., 1977), para el tolueno (Sato y Nakajima, 1978) y para el n-hexano (Tsuruta, 1982), se describe que existe absorción a través de la piel que puede verse favorecida por otros disolventes, y puede producir un efecto sistémico, constituyendo una vía de importancia toxicológica directa o una vía de contribución en estos trabajadores expuestos.

En referencia a la valoración y cuantificación de los niveles ambientales de exposición a los disolventes mediante análisis de control ambiental, los resultados indican que, en la mayoría de las empresas analizadas, la exposición en los puestos de trabajo es bastante baja (tabla 30). El tolueno es el principal contaminante al que están expuestos los trabajadores, con unos niveles medios en ambiente de 90 mg/m^3 ($14\text{-}283 \text{ mg/m}^3$), aproximadamente la mitad del valor límite ambiental, VLA-ED propuesto por el INSHT establecido en 192 mg/m^3 . El n-hexano, sus isómeros, el heptano y otros contaminantes como la acetona, la metiletilcetona, el acetato de etilo y los xilenos estuvieron también presentes en el ambiente laboral, aunque a concentraciones medias muy por debajo de los VLA-ED propuestos por el INSHT.

Comparando nuestros datos con los descritos en la bibliografía encontramos los publicados en un estudio realizado entre noviembre de 2008 y marzo de 2009 en una fábrica de calzado y otra de cuero en León, (Guanajuato, México), en donde se analizaron varios disolventes orgánicos y como resultado detectaron concentraciones medias de Tolueno inferiores a las detectadas por nosotros en este trabajo. Estos valores encontrados fueron de $60,72 \text{ mg/m}^3$ (8 horas), mientras que los valores encontrados por nosotros son de $90,1 \text{ mg/m}^3$. (Flores-Hernández y cols., 2012). En el estudio realizado por Mendoza-Cantú y cols. (2006), en trabajadores de empresas dedicadas a la impresión, los niveles de tolueno en el ambiente de trabajo fueron de $52,80 \text{ ppm}$ ($199,4 \text{ mg/m}^3$) de media, con un intervalo de 10 a 760 ppm , dato muy superior al obtenido por nosotros y en el trabajo publicado por Jiménez-Garza y cols. (2012) sobre trabajadores de empresas de curtido de pieles, los niveles medios de tolueno encontrados en el puesto de trabajo fueron de 11 mg/m^3 , bastante inferiores a nuestros resultados. Pitarque y cols. (1999), obtienen, en empresas de calzado de Bulgaria, un rango de concentraciones de tolueno en el ambiente de trabajo comprendidos entre $96,0$ y $412,3 \text{ mg/m}^3$ excediendo en muchos casos, los límites de exposición descritos en la legislación en vigor que les afecta.

En relación al xileno, los valores ambientales obtenidos en empresas de reparación de carrocerías y pinturas de coches fueron de $14,9 \text{ mg/m}^3$ de media, (Jacobson y McLean, 2003), superiores a nuestros datos, aunque el tipo de

empresa no es comparable. Flores Hernández y cols. (2012), en las fábricas de calzado y cuero antes comentadas, obtuvieron valores de $260,66 \text{ mg/m}^3$ muy superiores a los encontrados por nosotros, ($0,9 \text{ mg/m}^3$) que son despreciables.

Para el n-hexano, encontramos descritos en la bibliografía, valores medios en empresas de calzado de 106 mg/m^3 , superiores a los obtenidos por nosotros (Ruiz y cols., 2014). En la publicación de Flores Hernández y cols. (2012), no se realizaron análisis de n-hexano, por lo que este dato no es comparable.

Al igual que ocurre con los niveles ambientales, el control biológico de los diferentes disolventes muestra valores medios inferiores a los límites propuestos por el INSHT para los respectivos indicadores biológicos urinarios, excediéndose, no obstante, el VLB del ácido hipúrico en un 15% de los trabajadores expuestos (25 casos) y el de la 2,5-hexanodiona libre y total en una menor proporción (1,5%, 2 casos) del mismo grupo de trabajadores. El resto de los indicadores analizados no superó en ningún caso los respectivos VLB's. Concentraciones cuantificables de ácido hipúrico y 2,5-hexanodiona total fueron detectadas en la orina de trabajadores no expuestos aunque los valores siempre se encontraron por debajo de los respectivos VLBs, como era de esperar. Esto es debido a que el ácido hipúrico es un constituyente normal de la orina, que se origina principalmente a partir de alimentos que contienen ácido benzoico y benzoatos y la 2,5-hexanodiona, obtenida en condiciones de hidrólisis ácida de la orina, puede ser un producto del metabolismo intermedio o ser consecuencia de la contaminación ambiental (Perbellini y cols., 1993). Estas concentraciones detectadas de ácido hipúrico y 2,5-hexanodiona total en la orina de los trabajadores no expuestos o controles, se encuentran en todos los casos por debajo de los respectivos VLBs, y presentan valores medios significativamente inferiores a los obtenidos en el grupo de expuestos (figuras 15 y 16).

Relacionando los distintos indicadores biológicos con los respectivos valores ambientales de los disolventes analizados, no hemos encontrado una correlación clara entre la intensidad de la exposición, los niveles ambientales de los disolventes, y los respectivos indicadores biológicos urinarios. Pitarque y

cols (1999) si que obtienen para el tolueno, una relación significativa entre los valores ambientales y las concentraciones de ácido hipúrico en la orina de las trabajadoras de fábricas de calzado de Bulgaria.

Si que hemos encontrado un aumento significativo de las concentraciones de ácido hipúrico y de 2,5-hexanodiona libre y total en orina con la duración de la exposición a medida que aumentan las horas de trabajo semanales (tabla 36). Aquellos trabajadores expuestos a disolventes durante más de 40 horas semanales presentan niveles de estos indicadores biológicos en orina significativamente superiores a aquellos individuos expuestos durante jornadas estándares de 40 horas semanales o jornadas de menor duración. Los demás metabolitos analizados (ácidos metilhipúricos), presentaron concentraciones despreciables tanto en los trabajadores expuestos durante más de 40 horas/semana como los que solamente están expuestos en jornadas inferiores a 40 horas/semana.

Teniendo en cuenta la valoración de la influencia de factores ocupacionales en los niveles de estos indicadores biológicos y comparando con los hábitos higiénicos y medidas de protección personal seguidas por los trabajadores, hemos encontrado, que aquellos que no utilizan guantes a la hora de aplicar el adhesivo o manipular los disolventes y los que refieren ingerir alimentos en el puesto de trabajo, presentan mayores niveles de indicadores biológicos en orina (tablas 37 y 38). Estos resultados concuerdan con obtenidos por Cárdenas-Bustamante y cols. (2007) en trabajadores de fábricas de pinturas expuestos a VOC's en donde los trabajadores con niveles más altos de metabolitos en orina solo el 16% utilizaba equipos de protección para el manejo de solventes.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto la importancia de seguir unos hábitos higiénicos correctos y la necesidad de utilizar equipos de protección individual (EPIs tales como guantes, mascarillas y otros) para minimizar la absorción de los disolventes orgánicos por otras vías, además de la respiratoria, como son la dérmica y gastrointestinal.

5.2. GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS A PARTIR DE MUESTRAS DE MUCOSA BUCAL

5.2.1. FROTIS DE MUCOSA BUCAL

En este trabajo, previamente hemos realizado la puesta a punto de la metodología para el posterior análisis de los polimorfismos de CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1. Las muestras recogidas son de mucosa bucal obtenidas en los exámenes de vigilancia de la salud realizados a los trabajadores expuestos y no expuestos .

La técnica de RFLP-PCR, descrita previamente en el apartado 1.6.1, es la utilizada en el genotipado de las enzimas CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 tras la obtención de ADN genómico a partir de mucosa bucal y permite su uso en la búsqueda de determinantes individuales de susceptibilidad genética a tóxicos industriales.

Los valores de concentración y pureza DNA obtenidos en nuestro estudio son adecuados para poder llevar a cabo las técnicas de genotipado en este tipo de muestras, mediante el uso de PCR y RFLP u otros procedimientos similares como SSCP o RT-PCR. Son así mismo comparables a los que se obtienen a partir de sangre total, que es la fuente de material biológico más frecuentemente utilizada en los estudios de genotipado. La muestra se obtiene de forma rápida, no es invasiva y no requiere personal especialmente entrenado para su recogida. Es estable y se puede llegar a conservar hasta 10 meses a 4°C. (Richards y cols., 1993). Todo lo anteriormente expuesto refuerza la idea de que resulta interesante en estudios de epidemiología molecular en el campo laboral.

5.2.2. FRECUENCIAS DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

En las tablas 43 a 47 se muestran las frecuencias de los polimorfismos obtenidos en nuestro estudio y se comparan con los resultados publicados por otros autores para los mismos genes estudiados. Principalmente se utilizan los resultados obtenidos por Garte y cols. (2001) en el Proyecto de susceptibilidad genética a carcinógenos ambientales (GSEC, Project on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens) para la CYP2E1, GSTM1 y GSTT1, pero teniendo en cuenta que no se describen es esta publicación datos relativos a GSTP1. En este estudio se recogen los datos relativos a 15.000 sujetos sanos de diferentes grupos étnicos, sus frecuencias alélicas y genotípicas.

También hemos comparado nuestros resultados con los obtenidos por Torres y cols. (2008) que publica una evaluación del daño en el DNA de individuos expuestos laboralmente a solventes orgánicos, semejante al realizado en nuestro trabajo, aunque el campo laboral es diferente (pinturas y colas). Así mismo, hemos utilizado los resultados publicados por Testa y cols. (2005) sobre análisis de daño en el DNA de trabajadores de pintura de automóviles que están en contacto con disolventes orgánicos y los publicados por Heuser y cols. (2005) que realizan una comparación del daño genético en trabajadores del calzado brasileños expuestos a disolventes orgánicos, población de estudio muy semejante a la nuestra. Hemos abordado además, otras tablas con resultados de población sana, generalmente de individuos caucásicos, excepto en el trabajo de Chen y cols. (2010) en el que se refiere a población asiática.

Tabla 43. Frecuencias genotipos CYP2E1*5

		HOMOCIGOTO c1/c1 (1A/1A)	HETEROCIGOTO c1/c2 (1A/5B)	HOMOCIGOTO c2/c2 (5B/5B)
Nuestro estudio	expuestos	92,6%	7,4%	0%
	controles	93,8%	6,2%	0%
Torres y cols. (2008) (Colombia)	Expuestos	76,7%	6,7%	16,7%
	Controles	86,7%	8,3%	5,0%
Garte y cols. 2001 (Europa)	Población sana	92,4%	4,6%	3,0%
Heuser y cols. (2007) (Brasil)	Expuestos	82,1%	17,9%	0%
	Controles	69,1%	30,9%	0%
Ulusoy y cols. (2007) (Turquía)	Población sana	96,12%	3,8%	0,04%
Naccarati y cols.(2006) (Rep. Checa)	Población sana	92,30%	7,69%	0%
Rossini y cols. (2006) (Brasil)	Población sana	91%	8%	1%

Tabla 44. Frecuencias genotipos CYP2E1*6

		HOMOCIGOTO DD (1A/1A)	HETEROCIGOTO DC (1A/6)	HOMOCIGOTO CC (6/6)
Nuestro estudio	Expuestos	80%	15,7%	1,2%
	Controles	83,1%	19,3%	0,7%
Torres y cols. (2008) (Colombia)	Expuestos	53,4 %	43,3%	3,3%
	Controles	66,7%	8,3%	5%
Garte y cols. 2001 (Europa)	Población sana	85,4%	13,8%	0,8%
Ulusoy y cols. (2007) (Turquía)	Población sana	83,98%	15,53%	0,49%
Naccarati y cols.(2006) (Rep. Checa)	Población sana	87,0%	13,0%	0,0%
Rossini y cols. (2006) (Brasil)	Población sana	84,8%	14,5%	0,7%

Tabla 45. Frecuencias genotipos GSTM1

		Genotipo GSTM1*1 (positivo)	Genotipo GSTM1*0 (nulo)
Nuestro estudio	Expuestos	51,7%	48,3%
	Controles	54,4%	45,6%
Torres y cols. (2008) (Colombia)	Expuestos	43,3%	56,7%
	Controles	50,0%	50,0%
Garte y cols. (2001) (Europa)	Población sana	46,9%	53,1%
Naccarati y cols.(2006) (Rep. Checa)	Población sana	54,7%	45,3%
Heuser y cols. (2007) (Brasil)	Expuestos	61,5%	38,5%
	Controles	41,8%	58,2%
Testa y cols. (2005) (Italia)	Población sana y expuesta. Total	51%	49%

Tabla 46. Frecuencia de genotipos para GSTT1

		Genotipo GSTT1*1 (positivo)	Genotipo GSTT1*0 (nulo)
Nuestro estudio	Expuestos	80,7%	19,3%
	Controles	78,3%	21,7%
Torres y cols. (2008) (Colombia)	Expuestos	53,3%	46,7%
	Controles	66,7%	33,3%
Thier y cols. 2003 (Alemania)	Población sana	75%	25%
Naccarati y cols.(2006) (Rep. Checa)	Población sana	81,2%	18,7%
Heuser y cols. (2007) (Brasil)	Expuestos	82,1%	17,9%
	Controles	80%	20%
Testa y cols. (2005) (Italia)	Expuestos	65,0%	35%
	Controles	76%	24%

Tabla 47. Frecuencia de genotipos para GSTP1

		HOMOCIGOTO AA (Ile/Ile)	HETEROCIGOTO AG (Ile/Val)	HOMOCIGOTO GG (Val/Val)
Nuestro estudio	Expuestos	48,6%	50,0%	1,4%
	Controles	35,0%	62,5%	2,5%
Heuser y cols. (2007) (Brasil)	Expuestos	43,6%	35,9%	20,5%
	Controles	43,6%	43,6%	9,1%
Galvañ y cols. (2011) (Argentina)	Población sana	41,8%	47,06%	11,76%
Naccarati y cols.(2006) (Rep. Checa)	Población sana	53,1%	39,1%	7,8%
Chen y cols. (2010) (Taiwan)	Poblacion sana	70,5%	27,7%	1,8%

En general, los resultados obtenidos al analizar las frecuencias de genotipos obtenidos por nosotros, para los diferentes alelos CYP2E1*5B, CYP2E1*6, GSTM1 y GSTT1 entre individuos expuestos y controles son semejantes entre ellos, presentando una variabilidad muy baja. No ocurre lo mismo en el caso de GSTP1, en donde existen diferencias de alrededor del 13% entre los resultados obtenidos en expuestos y controles para los genotipos AA y AG.

Estos resultados obtenidos (tabla 32) concuerdan bastante bien con los descritos en caucásicos por Garte y cols., (2001), para los genotipos de los alelos estudiados de la CYP2E1 (alelo CYP2E1*5B, y CYP2E1*6) y en general para los del grupo de las GST's. Para el gen GSTT1 la frecuencia del genotipo nulo referenciada en la literatura es alrededor del 20% en caucásicos (Thier y cols., 2003) coincidiendo plenamente con nuestros resultados. No obstante para el gen GSTM1, la frecuencia obtenida para el genotipo nulo (presencia de delección, GSTM1*0) es algo inferior a la referenciada en la mayoría de poblaciones caucásicas, que es de alrededor de 50% (Houlston, 1999).

En la tabla 43 observamos que para la CYP2E1*5, en nuestro colectivo de trabajadores, no se han detectado individuos homocigotos para el genotipo c2/c2. Únicamente se encuentran individuos c1/c1 y c1/c2. El alelo c2 presenta una frecuencia ligeramente más baja en los controles que en los expuestos, pero que podemos considerar irrelevante. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros trabajos, observamos que, existe una ligera desviación entre resultados para individuos expuestos, en el caso de los valores descritos por Heuser y cols. (2007), (ya hemos comentado anteriormente que su población de estudio es muy semejante a la nuestra), siendo esta desviación bastante mayor en el caso de los controles. También observamos que entre sus propios valores sus resultados son diferentes entre expuestos y controles (10-15%), cosa que no ocurre en nuestro estudio en donde los resultados que hemos obtenido entre los dos grupos son del mismo orden. Cuando comparamos con los datos publicados por Garte y cols. (2001) para población caucásica sana, nuestros resultados son concordantes con los suyos, así como para los obtenidos por Ulusoy y cols. (2007), Naccarati y cols. (2006) y Rossini y cols. (2006). Cuando comparamos con los resultados obtenidos por Torres y cols. (2008) observamos que en el caso de los individuos expuestos, los valores encontrados para el homocigoto c2/c2, son considerablemente más altos, en comparación con los resultados obtenidos por los demás investigadores. Este elevado porcentaje, modifica sustancialmente los porcentajes obtenidos para el homocigoto c1/c1 y heterocigoto c1/c2 que proporcionalmente son comparables y del mismo orden que los demás

resultados de la tabla. En el caso de los resultados obtenidos para los controles, se diferencian ligeramente de nuestros datos, pero podemos considerar que son comparables.

En todos los trabajos consultados, observamos que el genotipo que se encuentra en mayor proporción es el homocigoto $c1/c1$, mientras que el genotipo $c2/c2$ es muy poco frecuente. En nuestro caso los resultados obtenidos para este genotipo son inferiores a los de Garte (3,0%), y semejantes a los encontrados en las demás publicaciones. Comparando por razas los valores de estos genotipos, observamos que los individuos asiáticos presentan una proporción diferente a la de los caucásicos en donde el genotipo $c1/c2$ está presente en un 36% de la población estudiada, y el genotipo $c2/c2$, aparece un un 5% de los casos (Garte y cols., 2001). Este genotipo homocigoto $c2/c2$ de CYP2E1*5B puede estar asociado con un aumento del riesgo de varios tipos de cáncer en caucásicos (Zhou y cols., 2010).

Se ha descrito en la bibliografía, que en individuos japoneses con el genotipo $c2/c2$ de CYP2E1 presentan mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades hepáticas alcohólicas, al tiempo que se ha descrito una interacción entre los genotipos de ALDH2 y CYP2E1 con el consumo de alcohol, de forma que los portadores del alelo $c2$ de CYP2E1 y del genotipo normal de ALDH2 presentarán una mayor tolerancia al consumo de alcohol y al desarrollo de enfermedades hepáticas asociadas (Sun y cols., 1999). Según publica Segado y cols. (2005), esto puede ser debido a que en aquellos individuos bebedores y portadores del alelo $c2$ de CYP2E1 se puede producir una cantidad de acetaldehído superior a los portadores del alelo normal debido a la mayor actividad enzimática del citocromo, que, aunque será posteriormente transformada en acetato, vía ALDH2, puede tener un papel relevante en el desarrollo de hepatopatías alcohólicas habida cuenta del tiempo que puede permanecer en el hígado hasta que la ALDH2 es capaz de eliminarlo .

El alelo $c2$ de CYP2E1*5B presenta una expresión alterada que puede estar asociada con elevados niveles de proteínas en hígado, comparando siempre con el genotipo homocigoto CYP2E1*c1/c1 (Tsutsumi y cols., 1993).

Analizando nuestros resultados para la CYP2E1*6, (tabla 44), y comparando los obtenidos para controles y expuestos, encontramos que los resultados son semejantes y positivos tanto para los homocigotos DD (mayoritario) y CC (minoritario) en expuestos y controles, pero en el caso del heterocigoto DC, observamos ligeras diferencias entre resultados, ya que se obtienen valores más elevados en los individuos control que en expuestos.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, estos son semejantes a los publicados por Garte y cols. (2001) para población caucásica, Naccarati y cols. (2006), Ulusoy y cols. (2007), y Rossini y cols. (2006), todos ellos referidos a población sana. Comparando con los resultados obtenidos por Torres y cols. (2008), observamos que estos, son más elevados que los obtenidos por nosotros y por los demás autores para los genotipos DD, DC y CC en expuestos. Únicamente resultan comparables los datos obtenidos para los controles en el caso del heterocigoto DC. En el trabajo publicado por Rossini, se observan ligeras diferencias entre los genotipos de CYP2E1*5 en población blanca y no blanca en general, pero no se observan ninguna diferencia entre los genotipos de CYP2E1*6 para poblaciones blanca y de color. Existen diferencias entre las diferentes poblaciones respecto a los porcentajes de variantes genóticas de CYP2E1. Para elaborar nuestras tablas, hemos utilizados los datos publicados para población caucásica, pero hemos de tener en cuenta que en el caso de la población asiática se observa que los individuos homocigotos DD se encuentran en una proporción del 48,3%, los heterocigotos DC suponen el 42,3% de la población y los portadores de la variante CC están en un 9,4%, y que estos también difieren de los descritos para población africana. (Garte y cols., 2001)

Uematsu y cols. (1991), estudiaron este polimorfismo de la enzima CYP2E1, que da lugar a los dos alelos, C y D, en pacientes con cáncer de pulmón, y comprobaron que el riesgo de este tipo de cáncer, era mayor en portadores del alelo C (OR = 2,1), especialmente en el subgrupo de fumadores moderados, lo que indica que consumos más elevados anulan el efecto del componente genético. Datos experimentales indican que la formación de complejos ADN-carcinógeno en el tejido pulmonar humano es más elevada en sujetos

portadores del alelo raro C, detectado con la enzima de restricción Dral, especialmente en sujetos poco o nada fumadores. Dos estudios realizados en Europa, donde la frecuencia del alelo C es mucho más baja, no han detectado ninguna diferencia.

En un meta-análisis realizado por Wang y cols. (2010) se sugiere que ambos polimorfismos del CYP2E1 (Dral y PstI), de forma combinada, pueden afectar a la susceptibilidad del cáncer de pulmón, siendo necesarios estudios que evalúen la interacción entre ambos genes y el ambiente para evaluar este riesgo.

Algunos estudios han confirmado una asociación de los dos polimorfismos estudiados del gen CYP2E1. Bouchard y cols. (2000) mostraron que la asociación de Dral y PstI, se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de tracto digestivo. El genotipo CC ha sido asociado a un mayor riesgo de cáncer de cavidad oral (Sugimura y cols., 2006).

Para el gen GSTM1 (tabla 45), obtenemos en individuos expuestos una frecuencia de aproximadamente el 50% tanto del genotipo GSTM1 positivo (GSTM1*1) como del genotipo GSTM1 nulo (GSTM1*0), mientras que en los controles, la relación varía ligeramente presentándose en mayor número los individuos con el genotipo GSTM1*1 con una proporción del 54,4% frente al 45,6% de individuos GSTM1*0. Los resultados obtenidos para los individuos expuestos, se asemejan a los de la mayoría de poblaciones caucásicas (50%) (Houlston, 1999) mientras que los valores obtenidos para los controles varían ligeramente. La frecuencia del genotipo nulo varía en otras etnias, desde un 22% a un 63% siendo más alto para los caucásicos y más bajo para los africanos (Garte y cols., 2001).

Comparando nuestros resultados con los publicados por otros autores, encontramos diferencias significativas cuando los relacionamos con los de Heuser y cols. (2007) lo que supone una variación entre resultados del 20% para los individuos expuestos. Los valores encontrados para trabajadores expuestos a disolventes orgánicos en empresas de calzado brasileñas y

publicados por Heuser y cols. son superiores al 60% en los individuos que presentan el genotipo GSTM1*1 y solamente un 38,5% de los expuestos presentan el genotipo nulo, mientras que en el caso de los controles ocurre al revés, los valores publicados para el genotipo nulo son superiores a los de los individuos con genotipo positivo. Nuestros resultados se relacionan correctamente con los datos de Testa y cols. (2005) y los de Naccarati y cols. (2006). En relación a los resultados publicados por Torres y cols. (2008) observamos que sus datos entre el genotipo GSTM1*1 y GSTM1*0 en individuos expuestos son más parecidos a los obtenidos por Garte y cols. (2001), que a los nuestros, debido a que obtienen unas cantidades de individuos con genotipo nulo superiores a los positivos. En el caso de los controles, nuestros datos son comparables con los de Testa y cols. (2005) y semejantes a los de Torres y cols. (2008), ligeramente desviados.

El genotipo nulo de GSTM1 (GSTM1*0), comprende aproximadamente el 50% de los individuos caucásicos según los datos obtenidos y publicados por Garte y cols. en 2001. Este genotipo se ha considerado un factor de riesgo en varios tipos de cáncer relacionados con el tabaco. En muchos estudios se le ha relacionado con cáncer de pulmón y de vejiga en fumadores (Norppa, 2004). Sin embargo los últimos meta-análisis realizados sobre este tema, sugieren un ligero aumento del riesgo de cáncer de pulmón pero sin interacción con el tabaco, aunque si encuentran una ligera relación del genotipo con fumadores y cáncer de vejiga (Norppa, 2004). Con respecto a otros estudios, no se ha encontrado relación entre este genotipo y el riesgo de sufrir cáncer colorrectal (Rudolph y cols., 2012). Bhat y cols. (2012) encontraron que existe una interacción entre los genotipos nulos de los genes GSTM1 y GSTT1, y que los individuos portadores de ambos genotipos tienen un riesgo elevado de leucemia mieloide crónica.

Para el gen GSTT1, (tabla 46), hemos obtenido en expuestos, una frecuencia de 80,7% del genotipo GSTT1 positivo (GSTT1*1) y un 19,3% de individuos GSTT1 nulo (GSTT1*0). En los individuos control, la relación entre individuos con genotipo positivo y los nulos, es semejante a la de los expuestos: los que presentan el genotipo GSTT1*1 se encuentran en una proporción del 78,3%

frente al 21,7% de individuos GSTT1*0. La frecuencia del genotipo nulo de GSTT1 varía desde un 13% a un 28% entre individuos caucásicos por lo que nuestros resultados concuerdan con estos datos (Thier y cols., 2003) (Naccarati y cols., 2006). Comparando entre diferentes etnias, este genotipo resulta ser más alto en individuos asiáticos (47%) (Garte y cols., 2001).

Se ha observado que existen claras diferencias de un 30% entre los datos obtenidos para el genotipo nulo de GSTT1 entre la población de escandinavos y el resto de caucásicos europeos (Garte y cols., 2001). Esta variabilidad no está estudiada claramente, pero se debe tener en cuenta a la hora de comparar resultados de frecuencias alélicas, obtenidos en estudios de casos y controles cuando los sujetos pueden proceder de diferentes orígenes, dentro de Europa.

Al comparar nuestros resultados con los publicados por otros autores, observamos que no existen diferencias significativas entre nuestros datos y los de Heuser y cols., (2007) tanto en controles como en individuos expuestos a disolventes orgánicos en empresas de calzado brasileñas (población de estudio semejante a la nuestra). Los resultados obtenidos para los individuos expuestos, se asemejan a los publicados por Naccarati y cols., (2006), obtenidos en población sana europea. Así mismo, nuestros resultados difieren bastante de los publicados por Testa y cols., (2005) en el caso de los correspondientes a los trabajadores expuestos, y son semejantes para los resultados obtenidos de los individuos control. Al relacionar nuestros datos con los publicados por Thier y cols., (2003) para población caucásica sana observamos grandes similitudes para los resultados de los controles y difieren ligeramente para los obtenidos en individuos expuestos. Los resultados publicados por Torres y cols., (2008) al estudiar el daño genotóxico en individuos expuestos a solventes orgánicos nos indican unas variaciones superiores al 20% entre los valores encontrados por su grupo de trabajo y los nuestros, tanto para individuos GSTT1*1 como GSTT1*0. En nuestro caso, tanto los individuos expuestos como los controles con genotipo positivo son bastante superiores en porcentaje a los suyos, invirtiéndose la proporción en el caso de los que presentan genotipo nulo, siendo nuestros datos bastante inferiores a los suyos en los dos grupos de población estudiados.

Se ha visto que las sustancias químicas del grupo de los metil-haluros tienen gran afinidad por la GSTT1 en eritrocitos humanos, de hecho no existen otros GST's que metabolicen los metil-cloruros. La enzima GSTT1 cataliza la metabolización de diclorometano en formaldehído (Hallier y cols., 1994), por lo que valores elevados de la variante nula de esta enzima, pueden favorecer un incremento de riesgo de tumores (Thier y cols., 2002) en individuos portadores de la delección del gen GSTT1, al tener una capacidad alterada para eliminar metabólicamente estos compuestos. Así mismo, se ha observado que muchos de sus sustratos se utilizan en la industria química haciendo esta GST especialmente interesante en relación a la salud ocupacional (Thier y cols., 2002).

Para la GSTP1 (tabla 47) podemos observar entre nuestros resultados, que los obtenidos para controles y para expuestos difieren entre un 20 y 30% ambos valores. Hemos obtenido resultados mas elevados en el caso del homocigoto AA (Ile/Ile) en individuos expuestos (48,6%) que en los controles (35,0%) mientras que en el caso de los heterocigotos AG (Ile/Val) y homocigotos GG (Val/Val), siempre han resultado ser superiores en los controles.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, estos difieren ligeramente. En el caso de los valores encontrados por Naccarati y cols., (2006) para población sana europea, ellos obtienen unos datos superiores para los homocigotos AA que para los heterocigotos AG al revés que en nuestra población de estudio y además sus valores para el homocigoto GG son bastante elevados comparándolos con los que hemos obtenido tanto en expuestos como en controles. Cuando se comparan con los de Galvañ y cols., (2011), estudio realizado sobre población sana argentina, observamos nuevamente que sus datos son superiores en los homocigotos AA y bastante elevados para el homocigoto GG (11,76%) y por tanto, podemos pensar que pueden haber diferencias entre individuos caucásicos dependiendo de la zona donde vivan (como ya ocurre con la enzima GSTT1 y los habitantes de países nórdicos en comparación con el resto de europeos). Chen y cols. (2010) presentan unos valores de homocigoto GG semejantes a los nuestros, no

ocurriendo lo mismo con los valores obtenidos para el homocigoto AA y heterocigoto AG. Estos valores son obtenidos sobre población asiática.

Cuando comparamos nuestros valores con los obtenidos por Heuser y cols (2007) observamos grandes diferencias al comparar sus resultados obtenidos para el polimorfismo GG en individuos expuestos con los nuestros (1,4% frente a 20,5%) aunque el problema puede ser debido a que la muestra que ellos han utilizado es bastante inferior a la nuestra (39 trabajadores brasileños y 167 trabajadores españoles), por lo que un resultado positivo en su muestra, supone un porcentaje bastante superior al que nosotros obtendríamos. En el caso de los controles, refieren en su publicación, que tienen un 3,6% de muestras perdidas, lo que no modificaría sustancialmente la diferencia de resultados. Respecto a los resultados obtenidos para los individuos homocigotos AA y heterocigotos AG, sus datos son muy semejantes entre si en expuestos y controles, mientras que en nuestros resultados los porcentajes de AG en controles doblan las cantidades encontradas para los portadores de la variante AA del gen GSTP1.

En el trabajo de Garte y cols. (2001), no obtienen suficientes datos para publicar referentes a GSTP1, por lo que no podemos compararlos con nuestros resultados.

GSTP1 tiene particular importancia en la detoxificación de tóxicos inhalados puesto que es la isoforma de GST más abundante en los pulmones (Heuser y cols., 2007). Se ha sugerido que los polimorfismos genéticos de GSTP1 tienen una relevancia funcional sobre el producto del metabolismo del gen GSTP1, dando como resultado una función de desintoxicación anulada o reducida, y por lo tanto, la acumulación de niveles más altos de carcinógenos activos en el pulmón (Miller y cols., 2006). En estudios publicados por Ryberg y cols. (1997), se asocia la presencia del genotipo Val/Val con un aumento de aductos de DNA en linfocitos de sangre periférica y con cáncer de pulmón. En el estudio de Heuser y cols. (2007) se observa que los individuos GSTP1 Ile/Ile más jóvenes parece aportarles este polimorfismo una mayor protección frente al daño en el DNA (estudiado mediante el ensayo del cometa), pero no ocurre lo mismo en

los individuos mas mayores por lo que sugieren que existe una activación del gen relacionada con la edad.

Las variantes polimórficas de GSTP1 parecen dotar de protección contra el asma después de la exposición profesional a diisocianato de tolueno (TDI) (Betancourt y cols., 2014). La frecuencia del homocigoto de GSTP1*Val (fuertemente expresado en el epitelio respiratorio), fue significativamente menor en pacientes asmáticos expuestos a diisocianato de tolueno (TDI) durante al menos 10 años (Mapp y cols., 2002) que en sujetos control. De hecho, la presencia de este genotipo confiere un riesgo seis veces menor de padecer asma que el genotipo GSTP1 Ile(105)/Ile(105). El riesgo de desarrollar asma aumenta con el tiempo de exposición, pero el curso temporal sigue un patrón de una curva epidémica, con un período promedio de 1-2 año, compatible con el desarrollo de sensibilización y asma en una población susceptible. Sin embargo, el período latente entre el comienzo de exposición y el comienzo de los síntomas es muy variable (Mapp y cols., 2002). Este gen GSTP1*Val105 podría ser un protector de la enfermedad o al menos actuaría como un modulador, por lo que algunos sujetos llegan a desarrollar asma después de varios años de exposición y explicaría en parte el por qué algunos sujetos expuestos desarrollan asma y otro no (Betancourt y cols., 2014).

En una publicación reciente, se estudian los genotipos de las enzimas GSTM1, GSTT1 y GSTP1, y concluyen que el genotipo GG de GSTP1 se relaciona con una mejor respuesta a la quimioterapia y por tanto a la mayor supervivencia en pacientes con cierto tipo de carcinoma de pulmón (non-small cells) (Jia y cols., 2016)

5.3. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 A PARTIR DE SANGRE TOTAL.

En nuestro trabajo hemos realizado la determinación del fenotipado de las enzimas estudiadas mediante la cuantificación de mRNA específico de los genes correspondientes a partir de muestras de sangre total, que fueron recogidas en tubos especiales que contienen un estabilizador de RNA (Paxgen tube). A partir de ellas, se realiza la extracción de RNA, la retrotranscripción a cDNA y la cuantificación mediante RT-PCR. Los resultados de la cuantificación se expresan utilizando el método comparativo de Ct, previamente descrito por Livak y Schmittgen, (2001), que calcula el nivel de expresión del gen normalizado a un endógeno de referencia (β -actina) y relativo a un calibrador, tal y como se describe en el apartado de material y métodos. El método utilizado es rápido y puede permitir el fenotipado para la expresión de las enzimas en estudios epidemiológicos, programas de control y monitorización de trabajadores expuestos.

A pesar de que la degradación del mRNA ha sido minimizada al máximo en las diferentes etapas del proceso analítico, existen puntos en los que hay que tener especial cuidado a la hora de trabajar con RNA, para obtener posteriormente unos resultados adecuados. En primer lugar durante la recogida de las muestras en donde se utilizan tubos especiales con conservante y estabilizador del RNA y durante las etapas posteriores se tendrá especial cuidado en cuanto a la temperatura y condiciones de conservación del RNA extraído y del cDNA producto de la reacción de retrotranscripción. Los resultados obtenidos en placas de electroforesis realizadas en las etapas intermedias revelan la degradación del RNA para algunas muestras y la obtención de bandas muy débiles también en un número importante de las mismas.

Podemos decir, que la etapa más crítica es la retrotranscripción, (RT) o sea, el paso de RNA a cDNA, que se ha de realizar en el menor tiempo posible para evitar la degradación de la muestra, ya que la molécula de RNA es muy inestable. Menos crítica parece la conservación de las muestras de sangre en

los tubos especiales PAXgene ya que el conservante especial contenido en estos tubos evita la degradación y mantiene estabilizado el RNA previo a su extracción durante largo periodo de tiempo a la temperatura de -20° C.

Para la enzima CYP2E1, nuestros resultados indican que el nivel de expresión en el grupo de individuos expuestos a VOC's es mayor que en el de los controles (tabla 34), como también se ha encontrado en otros trabajos previos con otros disolventes como el estireno (Prieto y cols., 2010). Esto no se corresponde con los resultados obtenidos por Jimenez-Garza y cols. (2012) en trabajadores mejicanos, en donde obtienen valores de actividad enzimática inferiores en expuestos que en controles. No obstante estos trabajadores mejicanos, presentaron niveles de exposición a tolueno, bastante inferiores a los nuestros (aproximadamente el 10% de la media de nuestros valores). Este descenso de la actividad de la CYP2E1 podría representar un riesgo para la salud de los trabajadores ya que estarían menos protegidos contra los sustratos de CYP2E1 presentes en el puesto de trabajo (Jimenez-Garza y cols., 2012).

La técnica utilizada en el trabajo de Jimenez-Garza y cols. (2012), es la denominada hidroxilación de clorzoxazona, CZX (Streetman y cols., 2000). Este método requiere el uso de un fármaco de prueba el cual se administra por vía oral, a nivel hepático se transforma en 6-hidroxiclorzoxazona (HCZX) (Peter y cols., 1990). El aclaramiento de HCZX, es la medida usada para determinar la actividad de CYP2E1. El método tiene algunas limitaciones como son la administración de un fármaco con las consecuentes implicaciones éticas, toma de muestras de sangre y orina, y las dificultades existentes en la interpretación de los resultados cuando se administra CZX con otros xenobióticos (Palmer y cols., 2001). Basándose en las observaciones experimentales, que muestran que la expresión de CYP2E1, en la fracción de linfocitos de células blancas, puede estar influenciada por los mismos factores que regulan la expresión del enzima hepático. Raucy y cols. (1999) y Yano y cols. (2001), desarrollaron un método para la cuantificación de mRNA del gen CYP2E1 en linfocitos de sangre periférica (PBLs). El método fue validado mediante estudios controlados para uso en humanos, mostrándose sensible, específico y ofreciendo la

posibilidad de determinar la inducción del enzima, especialmente cuando los polimorfismos genéticos de CYP2E1 están localizados en regiones no codificantes del mismo (Haufroid y cols., 2002).

En algunos estudios, los resultados obtenidos sugieren que tanto los efectos de inducción como los de inhibición de CYP2E1, pueden ocurrir en seres humanos expuestos a disolventes orgánicos (Piccoli y cols., 2010). En un estudio previo en sujetos expuestos ocupacionalmente a bajos niveles de tolueno, la exposición a este disolvente, aunque se consideraría asociada con un aumento significativo en el nivel de expresión de mRNA de CYP2E1 en linfocitos periféricos, no modificó el fenotipo CYP2E1 medido por el 6-OH-CHZ / CHZ (Mendoza-Cantù y cols., 2006). Sin embargo, en otro estudio, los sujetos expuestos profesionalmente a concentraciones más elevadas de diversos disolventes orgánicos, incluyendo tolueno y benceno, superiores o inferiores a los TLV, mostraron una reducción de aproximadamente un 50% de su relación metabólica media 6-OH-CHZ / CHZ en comparación con sujetos no expuestos (Lucas y cols., 1999).

En nuestro estudio, el nivel de expresión del mRNA de CYP2E1 disminuyó significativamente al aumentar los años de exposición, ($r=-2,02$, $p<0,01$) lo que está en concordancia con los resultados obtenidos por Jiménez-Garza y cols. (2012) en trabajadores expuestos a niveles bajos de tolueno que concluyen que el descenso de CYP2E1 se relaciona con el mayor tiempo de exposición acumulativa, factor que podría ser una desventaja para personas que lleven años trabajando en el mismo puesto de trabajo. De confirmarse este efecto, la disminución per se de la actividad enzimática de CYP2E1 podría representar un riesgo para la salud en trabajadores expuestos conforme aumenta el tiempo de exposición, ya que estos trabajadores podrían estar menos protegidos contra la acción de otros sustratos de la CYP2E1 (otros disolventes, alcohol, etc) y por consiguiente aumentaría el riesgo de sufrir diversas patologías.

En nuestro estudio, los niveles medios de expresión del mRNA de la CYP2E1 y GSTP1 en el grupo de trabajadores expuestos a disolventes, son significativamente mayores a los del grupo control, (tabla 34), lo que demuestra

la importancia de estas enzimas en el metabolismo de los disolventes orgánicos y la capacidad de estos disolventes, particularmente el tolueno, de inducir la expresión de CYP2E1, como sugieren otros estudios (Mendoza – Cantú y cols., 2006).

Existen varios factores, además de la exposición a xenobióticos, que pueden inducir los niveles de expresión de CYP2E1 y por tanto, se incrementaría su actividad metabólica. Esta inducción podría resultar un riesgo para la salud de las personas expuestas a sustancias protoxicantes o activadoras de CYP2E1, por lo que se deberían controlar los niveles de expresión en estos individuos. (Mendoza-Cantú y cols., 2006).

Encontramos relación entre los niveles de expresión de los genes estudiados y el consumo de alcohol y tabaco. La tendencia observada con respecto al alcohol y la CYP2E1 es esperable, ya que el etanol es un conocido inductor enzimático (Lieber, 1997). El etanol es un sustrato para la CYP2E1 y eleva los sus niveles de expresión. De hecho, estas dos propiedades explican la capacidad del etanol para inhibir el metabolismo de ciertos sustratos cuando el alcohol está presente, es decir, el etanol y el sustrato compiten por la oxidación por CYP2E1 (Lieber, 1997)

Con respecto a los fumadores los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con estudios que sugieren que el tabaco induce la actividad de la CYP2E1 en animales y humanos (Villard y cols., 1998); (Howard y cols., 2001); (Benowitz y cols., 2003). En este sentido Benowitz y cols. (2003), además de sugerir que el tabaco la induce, también mostraron que esta inducción enzimática contribuye a un mayor riesgo de cáncer.

Con respecto a la enzima GSTM1, los resultados obtenidos para los niveles de expresión del mRNA en los individuos expuestos, son superiores a los obtenidos para los controles, como hemos encontrado en otros trabajos con disolventes como el estireno (Esplugues, 2012). Para la GSTT1 ocurre al contrario, ya que en nuestros datos se observa un mayor nivel de expresión en controles que en expuestos. No obstante en ambos casos las diferencias no

son estadísticamente significativas (tabla 34). Para la enzima GSTT1 los resultados del nivel de expresión en sangre concuerdan con los publicados por Kordi-Tamandani y cols. (2011) obtenidos sobre muestras de sangre de pacientes con patologías hepáticas no alcohol dependiente y utilizando el mismo método que en nuestro estudio aunque debemos tener en consideración que tampoco sus resultados son estadísticamente significativos.

Los datos de nuestro estudio, referentes a la enzima GSTP1, presentan los resultados en la misma dirección que los encontrados para GSTM1 y CYP2E1, los valores encontrados para los niveles de expresión en individuos expuestos son superiores a los de los obtenidos para los controles En este caso los datos obtenidos son estadísticamente significativos ($p < 0,005$) (tabla 34). En el estudio de Kordi-Tamandani y cols. (2011), utilizando nuestro mismo método de análisis se obtuvo un mayor nivel de expresión en controles que en expuestos, pero las diferencias no fueron significativas.

Los resultados obtenidos para CYP2E1, GSTM1 y GSTP1, nos indicarían una posible activación enzimática debido a una exposición a disolventes orgánicos en el puesto de trabajo, excepto en el caso de la GSTT1 donde se podría producir una inhibición enzimática en los trabajadores expuestos por esa misma exposición.

No hemos obtenidos más datos en la bibliografía para poder comparar nuestros resultados para las enzimas estudiadas. Se han encontrado en algunos casos, datos relativos a líneas celulares y a células de mucosa procedentes de biopsias, pero en ningún caso, resultados procedentes de muestras de sangre, por lo que no los consideramos comparables.

Para las enzimas GSTM1, GSTT1, y GSTP1, se han propuesto algunos métodos de fenotipado que implican diferentes técnicas como pueden ser el ensayo enzimático ex vivo de la conjugación de TSO (trans-stilbencene oxide) como sustrato en linfocitos, por cuantificación en sangre utilizando un inmunoensayo (Inmunocuantificación), y por la aplicación de la reacción en

cadena de la polimerasa de DNA genómico con la caracterización de una mutación inactivante responsable para el alelo nulo (Brockmüller y cols., 1993).

Para la determinación de los niveles de GSTM1 Se ha propuesto la utilización de la técnica ELISA en linfocitos de sangre periférica mediante un kit comercial (Mukit, Biotrin International, Dublin). Esta técnica, es relativamente fácil de realizar, pero el kit descrito no se encuentra disponible en la actualidad (Mukanganyama y cols., 1997).

5.4. ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para realizar una adecuada evaluación del riesgo existente para la salud de los trabajadores expuestos a disolventes orgánicos, se requiere el uso de distintos parámetros que reflejan la exposición externa, la exposición interna, los efectos biológicos y la susceptibilidad individual. Este enfoque global debe proporcionar información fundamental acerca de la idoneidad de los biomarcadores seleccionados y contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos de los efectos de estos disolventes y sus metabolitos en humanos. Los marcadores de efecto biológico precoz, se refieren a aquellos que reflejan la presencia de un efecto biológico irreversible como resultado de un efecto tóxico, como son las aberraciones cromosómicas (CA) y los micronúcleos (MN).

En nuestro estudio hemos seleccionado como biomarcador de efecto biológico el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica, técnica que presenta ventaja frente a otras como las CA, ya que reflejan un daño similar a éstas pero es más fácil de evaluar y menos costosa en el tiempo (Fenech, 2003; 2007). El ensayo de MN es una alternativa al test de CA convencional, en el que se analizan las alteraciones presentes en metafases mitóticas y se detectan aberraciones cromosómicas de tipo estructural (efecto clastogénico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico) del agente en estudio. Así, se consigue reducir la dificultad de realizar el recuento, mejorar la sensibilidad del ensayo, incrementar la potencia estadística y reducir el coste del ensayo. Por

tanto, el ensayo de micronúcleos es útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. (Zalacaín y cols., 2005)

Tabla 48. Análisis de Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica

Publicación	Características de la población de estudio	Grupo	Total micronúcleos (CBMN)/1.000 células (media)
Nuestro estudio	Trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (industria del calzado)	expuestos	6,71
		Controles	3,40
Pitarque y cols (1999) (Bulgaria)	Trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (industria del calzado)	Expuestos planta A	27,94
		Expuestos planta B	45,05
		Controles	23,28
Pitarque y cols (2002) (España)	Trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (Personal aeropuerto)	Expuestos	7,08
		Controles	10,55
Cárdenas-Bustamante y cols (2007) (Colombia)	Trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (industria de pinturas)	Expuestos	7,0
		Controles	4,0
Testa y cols (2005) (Italia)	Trabajadores expuestos a disolventes orgánicos. (industria del automóvil)	Expuestos	6,68
Heuser y cols (2007) (Brasil)	Trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (industria del calzado)	Expuestos	4,53 ⁽¹⁾
		Controles	4,90 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Resultados obtenidos sobre 2.000 células

La media de los resultados encontrados respecto de la tasa de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas, en individuos expuestos es de 6,74 MN/1000 células, con un intervalo comprendido entre 0 y 32 MN/1000 células. En este grupo de expuestos un 11% de los individuos presentaron 10 o más micronúcleos (18 sujetos de los trabajadores expuestos). En el caso de los controles la media de resultados es de 3,4 MN/1000 células con un intervalo de entre 1 y 8 MN/1000 células por lo que en los individuos control, no se superan en ningún caso el valor 10. Al relacionar los valores de MN, obtenidos en función del sexo, (expuestos y controles), encontramos diferencias, significativamente mayores en mujeres $7,17 \pm 6,46$ MN (0-32) que en hombres $4,61 \pm 4,43$ MN (0-23) (figura 25). ($t=-2,14$, $p<0,05$), en concordancia con otros estudios (Bonassi y cols., 2001). No encontramos una relación estadísticamente significativa entre el consumo de tabaco y alcohol con el aumento de micronúcleos, pero sí con el consumo de fármacos.

Comparando nuestros datos con otros estudios realizados sobre muestras de trabajadores expuestos a disolventes orgánicos (y controles), encontramos que nuestros resultados se relacionan bastante bien con los publicados por Cárdenas-Bustamante y cols., (2007) para trabajadores expuestos a disolventes en industrias de pinturas de Colombia, con los publicados por Testa y cols. (2005) para trabajadores expuestos a disolventes que trabajan de la industria del automóvil, mientras que son bastante inferiores a los encontrados por Pitarque y cols. (2002) en trabajadoras de dos empresas de calzado de Bulgaria. Cuando comparamos con los obtenidos por Pitarque y cols. (2002) al analizar muestras de personal del aeropuerto de Barcelona observamos que la media de resultados es del mismo orden para los individuos expuestos en ambos casos pero los valores encontrados para los sujetos control en el trabajo de Pitarque y cols. (2002) son muy superiores a nuestros resultados. Estos resultados indicarían que el daño genotóxico es superior en los individuos no expuestos que en los que se encuentran continuamente en contacto con VOCs por motivos profesionales, lo que no resulta concordante con la finalidad perseguida por la técnica utilizada.

En la tabla 48 también se exponen los datos publicados por Heuser y cols. (2007) sobre individuos expuestos a disolventes en fábricas de calzado en Brasil referidos a micronúcleos en células binucleadas, pero sus resultados los refieren a MN/ 2.000 células, por lo que consideramos que los datos no son comparables. En este trabajo, el resultado obtenido entre expuestos y controles también es contrario a lo esperado, pero la diferencia no es muy significativa y los autores sugieren que los resultados obtenidos pueden estar relacionados con la edad de los individuos de la muestra por lo que a mayor edad, aumentaría la tasa de micronúcleos, y menos relacionados con los niveles de exposición.

Existen diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de MN. La edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose mayor edad con mayor índice de MN, tal como se ha comentado anteriormente y como se ha obtenido en nuestros resultados. Cheng y cols. (2013) obtienen, en una población de trabajadores expuestos a 1,3-butadieno, una relación directa entre la edad de los individuos y el daño cromosómico, encontrando que los individuos más mayores y con más años de trabajo tienen mayor daño que los más jóvenes y con menor tiempo en la empresa. Los mismos resultados se obtienen en el trabajo realizado por Silva y Santos-Mello (1995) en un estudio realizado sobre trabajadores de pintura de coches, en donde los MN aumentan con los años de exposición y edad.

En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal de MN superior a la de los hombres. Hemos observado que este valor se incrementa cuando se superan los 35 años de edad. Landi y cols. (2000), relacionan la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis, con un mayor índice de MN.

En relación al consumo de alcohol y tabaco y los niveles de MN, en la mayoría de publicaciones consultadas, los resultados obtenidos son semejantes a los nuestros. En el estudio realizado por Wang y cols. (2011) sobre trabajadores expuestos a monómero de cloruro de vinilo y utilizando la misma técnica que nosotros (CBMN), no encuentran relación entre el género de los individuos, el

consumo de alcohol ni de tabaco y la tasa de MN, pero si obtienen una relación significativa con la edad, semejante a los resultados obtenidos por nosotros. Consideran que puede ser debido a que la elevada exposición ambiental enmascara la relación con el tabaco y el alcohol y que el número de mujeres presentes en su estudio era relativamente bajo. Así mismo, Silva y Santos-Mello (1996) tampoco obtienen una relación entre el aumento de MN con el consumo de alcohol. Así mismo, consideran que el nivel de MN podría reducirse si los trabajadores expuestos utilizaran los equipos de protección adecuados.

Un estudio de genotoxicidad en trabajadores expuestos a bromuro de metilo, realizado por Calvert y cols. (1998), señala que puede existir un comportamiento a nivel celular, que implique falta de respuesta o una respuesta disminuida a una exposición (en relación al consumo de tabaco y alcohol). Este tipo de comportamiento se ha observado usando como biomarcador el ensayo de los micronúcleos, donde la ausencia de respuesta puede deberse a que el agente genotóxico en cuestión, produce una disminución en la proliferación celular o un aumento en la citotoxicidad. Mecanismos similares a estos, podrían explicar la relación inversa entre el tiempo de trabajo y la frecuencia de células picnóticas y de anomalías que denotan citotoxicidad (Castro y cols., 2004).

Con respecto al efecto de los metabolitos tóxicos del tabaco medido mediante el ensayo de MN existe una gran disparidad entre los resultados obtenidos entre expuestos fumadores y no fumadores. En un estudio, en el que intervinieron las 24 bases de datos implicadas en el proyecto HUMN, se ratificó la gran controversia y disparidad de los resultados con respecto al hábito fumador y su implicación en la formación de MN. a mayoría de los laboratorios participantes demostraron que no existían diferencias entre el grupo de fumadores y no fumadores; un único laboratorio encontró diferencias significativas entre ambos grupos y otros dos relacionaron el hecho de ser fumador con una disminución significativa en la frecuencia de MN. Por último, la conclusión extraída por la mayoría de laboratorios fue que los fumadores habituales que consumían 30 o más cigarrillos/día y que no estaban expuestos a

ningún otro agente tóxico externo manifestaban un incremento significativo en el número de MN; un estudio más reciente obtuvo las mismas conclusiones siendo el corte de consumo de tabaco de 20 cigarros/día. (Bonassi y cols., 2003); (Zalacain y cols., 2005)

En relación al uso de EPIs, se observa en el trabajo de Khayat y cols (2013), que la diferencia entre utilizar o no equipos de protección individuales en trabajadores expuestos a plaguicidas, es superior en un 137% de diferencia la tasa de MN en individuos expuestos que no utilizan EPI's a los que si los utilizan, una diferencia mucho más elevada a la que encontramos en nuestro estudio aunque de la misma tendencia. Debemos tener en cuenta que la técnica utilizada por estos autores es diferente a la nuestra, por lo que los datos en si, no son comparables. Así mismo no encuentran relación entre la tasa de MN y el consumo de tabaco y alcohol lo que concuerda con nuestros resultados.

Aunque no hemos encontrado específicamente ninguna cita relacionando consumo de medicamento y tasa de MN, existen trabajos en los que se demuestra una relación entre agentes tóxicos y frecuencia de MN. En trabajadores de las zonas hospitalarias o de fábricas cuya labor diaria les hace estar sometidos a la exposición de sustancias de carácter tóxico, presentan una mayor frecuencia de MN (Maffei y cols., 2002). El ensayo de MN también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados pesticidas y plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con humanos donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de MN (Lucero y cols., 2000).

El test CBMN utilizado para la determinación del posible efecto citogenético tras su estandarización usando el bloqueo de la citocinesis con citocalasina B es capaz de detectar un daño aunque el efecto sea muy bajo. La técnica es de fácil aplicación, presentando ventajas frente a otras técnicas convencionales que se han utilizado en el caso de exposiciones ambientales a genotóxicos y que presentan el inconveniente de que son muy costosas en el tiempo.

Existen numerosos estudios de análisis de micronúcleos en la bibliografía, que se llevan a cabo en muestras de mucosa bucal. Esta técnica es más simple a la hora de obtener la muestra y tiene la ventaja de que se realiza directamente sin la elaboración de cultivos aunque sus resultados no son comparables con los obtenidos a partir de muestras de sangre. Este ensayo es válido para medir la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos ya que las células de la mucosa bucal reflejan el efecto genotóxico ocurrido en la capa basal en las últimas tres semanas. (Zalacaín y cols., 2005).

En la actualidad, la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) permite la identificación del origen de los MN, permitiendo determinar con precisión el efecto clastogénico y/o aneugénico de cualquier agente genotóxico (Kirsch-Volders y cols., 2002).

5.5. RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES DE METABOLIZACIÓN ESTUDIADOS, CON SUS NIVELES DE EXPRESIÓN Y LOS INDICADORES BIOLÓGICOS

En el caso de la enzima CYP2E1, aunque no hemos encontrado una asociación estadística clara, observamos una menor expresión del mRNA en individuos portadores de alelo variante heterocigoto (c1/c2) del CYP2E1*5B con respecto al homocigoto silvestre (c1/c1), lo que indicaría una reducción en la inducibilidad del enzima en presencia de este polimorfismo (tabla 39). Esto está en consonancia con una publicación realizada por nuestro grupo de investigación en relación a la exposición a estireno en trabajadores del sector de astilleros, donde encontramos una reducción estadísticamente significativa en la expresión del mRNA del enzima CYP2E1 en individuos portadores de alelo variante heterocigoto (c1/c2) con respecto al homocigoto silvestre (c1/c1) de CYP2E1*5B (Prieto y cols., 2010).

Para el alelo CYP2E1*6 las tendencias que encontramos son similares, observando que los niveles de expresión obtenidos para el homocigoto wild type (TT) son los más elevados, siendo inferiores los correspondientes al

heterocigoto TA y presentando unos valores casi nulos para el homocigoto (AA) aunque las diferencias entre estos valores tampoco fueron significativas. Haufroid y cols. (2002), partiendo de linfocitos de sangre periférica (PLBs) para estudiar el fenotipado de CYP2E1, encontraron que los individuos con el alelo variante heterocigoto de CYP2E1*6 DC (TA), estaban asociados con una reducción de la expresión de CYP2E1, lo que coincide con nuestros resultados.

Los genotipos de la CYP2E1 se asocian con diferentes niveles de expresión de la actividad enzimática y estos niveles pueden ser inducidos por algunos sustratos como el etanol (Thier y cols., 2003). Esta inducción podría relacionarse con un mayor riesgo de enfermedad hepática o hepatotoxicidad. Aunque algunos autores han reportado la existencia de una elevación de los niveles de mRNA de la CYP2E1 (Tsutsumi y cols., 1993), la mayoría de los investigadores han encontrado una pequeña inducción o ligera reducción del nivel de mRNA de CYP2E1 después de la administración de etanol (Song, 1996). La tendencia observada con respecto al alcohol y la CYP2E1 en nuestro estudio, (apartado 4.8) es esperable, ya que el etanol es un conocido inductor enzimático. El alcohol es un sustrato de la CYP2E1 pero además aumenta sus niveles (Lieber, 1997). De hecho, estas dos propiedades del alcohol explican la capacidad del etanol de inhibir el metabolismo de ciertas sustancias cuando este alcohol está presente (Lu y Cederbaum, 2008).

Los niveles de expresión de las enzimas no mostraron correlación con los niveles ambientales de los disolventes ni con concentraciones urinarias de los indicadores biológicos analizados. No obstante la expresión del mRNA de CYP2E1 disminuyó significativamente al aumentar los años de exposición ($r=-2,02$, $p<0,01$) en concordancia con los resultados obtenidos en otros estudios en trabajadores mejicanos (Jiménez-Garza y cols., 2012).

De la misma manera que para los niveles de expresión, los resultados obtenidos para la relación del genotipo con la excreción urinaria de los indicadores biológicos, (tabla 40), hemos observado una disminución en la excreción de los metabolitos mayoritarios del tolueno y xileno (ácidos hipúrico y

metilhipuricos) así como de 2,5-hexanodiona (total y libre), metabolitos del n-hexano, en individuos portadores del alelo variante heterocigotos (c1/c2) del gen CYP2E1*5B con respecto a los homocigotos silvestres (c1/c1). La misma tendencia ocurre con CYP2E1*6 en donde los individuos portadores del alelo TA, presentan menor nivel de metabolitos en orina. Aunque en ambos casos los resultados no son significativos, nos indicaría que nuestros resultados son concordantes con los descritos por Heuser y cols (2007) en donde el genotipo CYP2E1 c1/c1 presentan unos niveles de ácido hipúrico de 0,94 g/g creatinina, mientras que para las variantes c1/c2 o c2/c2 estos valores solamente se encuentran en 0,57 g/g creatinina. Estos resultados indicarían una menor metabolización de VOC's en presencia de los polimorfismos c1/c2 y c2/c2.

En concordancia con nuestros datos sobre la relación del genotipo con la eliminación urinaria de metabolitos, Iba y cols. (2000) obtienen unos resultados de laboratorio, en ratas expuestas a n-hexano, donde la eliminación urinaria de 2,5-hexanodiona, es mayor y más rápida, en las que presentan el genotipo CYP2E1 c1/c1 que en las que presentan las variantes c1/c2 y c2/c2, por lo que extrapolando a humanos, la metabolización del n-hexano, después de la exposición sería mayor en individuos homocigotos CYP2E1 wild type.

Todas estas observaciones sugerirían, de confirmarse el efecto, una actividad reducida de la CYP2E1 en presencia de alelo variante de la CYP2E1*5B y CYP2E1*6, consistentes con lo encontrado en otros estudios (Bolt y cols., 2003), (Lucas y cols., 1995).

Y puesto que la CYP2E1 está asociada a la activación hacia productos más tóxicos en una gran variedad de xenobióticos, incluidos compuestos orgánicos, (Lucas y cols 2001), la mayor actividad puede inducir a daño en el DNA en leucocitos y menor actividad de GSTP1 (Heuser y cols 2007).

En cuanto a las enzimas del grupo de las GST, observamos que en el caso de la GSTM, el nivel de expresión es menor en el caso de controles que en expuestos aunque las diferencias no son significativa (tabla 34). También observamos una disminución estadísticamente significativa en la excreción de

la 2,5-hexanodiona libre en individuos con el genotipo nulo de la GSTM1 con respecto a los individuos no nulos, portadores del gen GSTM1 (tabla 40), lo que estaría en consonancia con la ausencia de actividad enzimática para ese genotipo. Esto mismo ocurre en el trabajo sobre marcadores genéticos y niveles de exposición en individuos expuestos a estireno (Esplugues, 2012), en donde encuentran una relación menor de metabolitos de estireno (PGA+MA) en la orina de trabajadores portadores del polimorfismo nulo de GSTM1. Este dato estaría en desacuerdo con un estudio realizado sobre la relación entre exposición crónica a n-hexano y neuropatía periférica en donde se evalúan las relaciones entre los polimorfismos de las enzimas involucradas en el metabolismo del n-hexano y los metabolitos eliminados, obteniendo como resultado que no existe relación entre GSTM1, GSTT1 y GSTP1 con el riesgo de daño neuronal periférico, y sí con el genotipo homocigoto AA de CYP2E1. Dado al que consideran el mayor responsable de la aparición de esta patología (Zhang y cols., 2006).

Con respecto a estudio de la relación entre el genotipo y la expresión fenotípica de los polimorfismos estudiados de la GSH (GSTM1, GSTT1 y GSTP1), los resultados tampoco son estadísticamente significativos (tabla 39) pero muestran un menor nivel de expresión de los genes GSTM1 y GSTT1 en individuos nulos (alelo deleciónado) con respecto a los individuos portadores del gen, e igualmente una disminución en el nivel de expresión del gen GSTP1 en presencia de la variante Val/Val lo que coincide con los resultados in vitro obtenidos por Ali-Osman y cols. (1997). Si consideramos sólo el grupo de las mujeres sí que encontramos diferencias significativas entre individuos nulos y no nulos en los niveles de expresión de GSTM1 y GSTT1 ($t=2,26$ $p<0,05$ y $t=4,48$, $p<0,001$), así como también para la enzima GSTT1 en el grupo de expuestos ($t=5,04$, $p<0,001$) (figura 25).

Se sabe que la exposición al tolueno induce daño oxidativo del DNA y el metabolismo se ve afectado por los polimorfismos genéticos de algunas de las enzimas estudiadas en este trabajo. En un estudio realizado sobre individuos sanos coreanos, se muestra que la relación entre la eliminación de ácido Hipúrico y la concentración de 8-OHdG (8-hidroxidesoxiguanosina) urinaria, es

modificada por polimorfismos genéticos de algunas enzimas metabolizantes como son la GSTM1, GSTT1 y ALDH2 (Kim y cols., 2011).

Todas estas observaciones muestran que el efecto combinado del fenotipo de las enzimas, medido mediante la expresión del mRNA específico en muestras de sangre total, unido al genotipo de los alelos estudiados para la CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1, pueden contribuir a explicar la variabilidad en la excreción urinaria de los metabolitos de los disolventes orgánicos metabolizados por estas enzimas.

5.6. RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS CON LOS POLIMORFISMOS, INDICADORES BIOLÓGICOS Y LAS VARIABLES RECOGIDAS EN LA HISTORIA CLÍNICA

La tasa de micronúcleos por 1.000 células binucleadas encontrada en la muestra de trabajadores expuestos es de 6,71 micronúcleos/1000 células de media, con un rango comprendido entre 0 y 32. Estos valores son significativamente más altos que los encontrados en controles, 3,4 micronúcleos/1000 células con un rango comprendido entre 1 y 8. Nosotros hemos relacionado nuestros resultados con los publicados por diversos autores para muestras semejantes, pero debemos tener en cuenta que no existen valores normales que nos indiquen la existencia o no, de daño genético. Estos valores obtenidos para la tasa de micronúcleos, deberían ser comparados con una población control o con la misma población de estudio a lo largo del tiempo y poder así observar las variaciones sufridas en diferentes momentos.

En nuestro estudio la tasa de MN no mostro correlación con los niveles ambientales de los disolventes detectados en el puesto de trabajo. Pitarque y cols. (2002) indican que la exposición a disolventes orgánicos en el ambiente de trabajo puede ser la causa del aumento de MN en trabajadoras expuestas en las fábricas de calzado. Nuestros resultados podrían ser debidos a la existencia de bajos niveles de VOC's en el ambiente. Así mismo, nuestros

resultados podrían ser comparables a los obtenidos por Pitarque y cols. (1999) en trabajadores de aeropuerto donde las concentraciones ambientales de disolventes orgánicos son muy bajas, debido al trabajo en exteriores y por tanto también es baja la tasa de MN. Aunque debemos tener en cuenta que la presencia de un resultado más elevado de micronúcleos en los individuos expuestos que en los controles, nos indicaría que los trabajadores de las fábricas de calzado que han formado parte de nuestro estudio, habrían estado expuestos a sustancias de carácter genotóxico.

En cuanto a la relación de la tasa de micronúcleos con los niveles de metabolitos en orina, encontramos que existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre la tasa de MN y las concentraciones urinarias de ácido hipúrico encontradas. Estos datos no se relacionan con los publicados por Heuser y cols. (2007) en trabajadores de la industria del calzado brasileños, que detectan daño genético utilizando el ensayo del cometa y un aumento de ácido hipúrico en orina, pero obtienen resultados inferiores a los nuestros en el estudio de las frecuencias de los micronúcleos (datos medidos en 2000 células).

Las mutaciones y variaciones de los genes estudiados, heterocigotos y homocigotos de corte de CYP2E1 y GSTP1 e individuos nulos de para GSTM1 y GSTT1, presentaron mayores frecuencias de micronúcleos con respecto los genotipos silvestres y los individuos no nulos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En relación al efecto del tabaco sobre la tasa de MN en las diversas publicaciones consultadas, existe disparidad de resultados: por ejemplo en el trabajo de Testa y cols. (2005), obtienen resultados mas elevados de daño cromosómico en trabajadores no fumadores expuestos a disolventes en pinturas de coches que en los que son fumadores. Esto puede ser debido a que existe una susceptibilidad individual que puede inducir modificaciones en el metabolismo de cada persona (Jang y cols., 2012).

Cuando relacionamos el efecto del genotipo con la tasa de MN, los resultados obtenidos son bastante inconsistentes y en ningún caso son significativos. Pero si que encontramos que los valores obtenidos para los genotipos nulos de GSTM y GSTT, las variables heterocigotas de CYP2E1 y los polimorfismos Ile/Val y Val/Val de GSTP1, presentan niveles superiores de MN, tal como sería de esperar. Según Heuser (2007), los polimorfismos nulos de GSTM1 y GSTT1, aumentan el riesgo de daño en el DNA y pueden favorecer el desarrollo de diversos tipos de cáncer. En este mismo estudio los autores encuentran un incremento significativo de MN en sujetos no fumadores GSTM1 nulo, en comparación con individuos GSTM1 positivo del grupo control en donde si se incluyen individuos fumadores. De acuerdo con Norppa (2004), los polimorfismos de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos pueden favorecer el daño cromosómico si participan en el metabolismo innato, importante para la integridad cromosómica o si su sustrato es una genotoxina, sustancia a la que la mayoría de las personas están expuestas (Heuser y cols., 2007).

El genotipo GSTM1*0 se ha asociado con un incremento de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de fumadores y conductores de autobuses, (Knudsen y cols., 1997). También se ha asociado a un incremento de SCEs (intercambio de cromátidas hermanas) en fumadores y no fumadores (Cheng y cols., 1995). El genotipo nulo de GSTT1 ha sido asociado con una mayor frecuencia basal de aberraciones cromosómicas de linfocitos (Singh y cols., 1990).

En un trabajo realizado sobre individuos expuestos a butadieno, se obtienen mayores frecuencias de MN en individuos con genotipos nulos de GSTM1 y GSTT, datos concordantes con los de nuestro estudio, mientras que no obtienen relación entre los polimorfismos de GSTP1 y la tasa de MN, lo que difiere de nuestros datos. En esta misma publicación comentan que estas frecuencias son aun mayores cuando se combinan los polimorfismos nulos de GSTM1 y GSTT1 en un mismo individuo. (Cheng y cols., 2013).

Tan y cols. (2010) mostraron que las variantes c1/c2 y c2/c2 para el gen CYP2E1 se asocian con el aumento de la frecuencia de MN en trabajadores expuestos a 1,3-butadieno, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados. Pero en el mismo trabajo obtienen también un aumento de MN en los genotipos positivos de GSTM1 datos que no concuerdan con los obtenidos por nosotros ya que, aunque no son estadísticamente significativos, resultan más elevados los obtenidos para la variante deletada que para el genotipo positivo. Wan y cols (2002) indican que los genotipos c1/c2 y c2/c2 para el gen CYP2E1 están relacionados con la toxicidad producida por el benceno y el monómero de cloruro de vinilo.

En relación a los resultados encontrados en nuestro trabajo sobre la relación entre la tasa de MN y los medicamentos, en la bibliografía se describen varios estudios en los que se ha demostrado que los complejos químicos incrementan de modo significativo el número de MN (Migliore y cols., 1991) (Jagetia y cols., 2001). Diversos estudios se han centrado en el estudio de las drogas citostáticas utilizadas en los protocolos antitumorales en pacientes con cáncer, cuya acción está dirigida a frenar la proliferación celular. La exposición reiterada a agentes citostáticos puede causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer entre el personal que maneja estas sustancias, debido a que pueden inducir daños genéticos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente. En un estudio realizado sobre trabajadores de hospital que manejan citostáticos, se obtuvieron resultados de aumento de la frecuencia de micronúcleos en células obtenidas a partir de mucosa bucal en todos los trabajadores que están en contacto con estos fármacos. Los resultados no son comparables con los nuestros debido a que la muestra y la técnica utilizadas son diferentes, pero nos ayuda a comprender que toda la información relativa al daño genético puede ser importante en la estimación del riesgo carcinogénico del personal con exposición ocupacional

Todos estos resultados ponen de manifiesto la imposibilidad de establecer rangos normales/anormales en los MN, que viene dada por la gran cantidad de variables que intervienen en su producción: variabilidad genética, género, edad,

estilo de vida, etc. (Fenech y Bonassi, 2011). Los resultados encontrados en este estudio sugieren que los polimorfismos estudiados, la edad, el sexo y las horas de exposición pueden influenciar la inducción del daño citogenético por disolventes en trabajadores expuestos a disolventes orgánicos.



6. CONCLUSIONES



En base a los objetivos y a los resultados encontrados y discutidos podemos concluir:

1. Los resultados de la cuantificación de la exposición mediante control ambiental realizada a los trabajadores indican que la exposición a disolventes está dentro de los valores establecidos en la reglamentación vigente, siendo el tolueno, el principal contaminante al que están expuestos los trabajadores.
2. El control biológico realizado a los trabajadores expuestos muestra también valores medios muy por debajo de los respectivos valores límite vigentes para los indicadores biológicos.
3. En cuanto a las condiciones higiénicas, casi el 40% de los puestos de trabajo no disponen de adecuados sistemas de extracción localizada de gases y vapores y más del 50% de los trabajadores no utilizan EPIs, como mascarilla y guantes, a la hora de aplicar el adhesivo dentro del proceso de montado del calzado.
4. Se ha demostrado un aumento significativo de las concentraciones de ácido hipúrico y de 2,5-hexanodiona libre y total en orina al aumentar la duración de la exposición, medida en horas de trabajo semanales, así como también en los trabajadores que no utilizan guantes y los que refieren ingerir alimentos en el puesto de trabajo, lo que pone de manifiesto la importancia de la absorción de los disolventes orgánicos por otras vías además de la inhalatoria y la necesidad de utilizar EPIs y seguir hábitos higiénicos correctos para minimizar esta absorción.
5. Los niveles medios de expresión del mRNA de la CYP2E1 y GSTP1 en el grupo de trabajadores expuestos a disolventes son significativamente mayores a los del grupo control, lo que demuestra la importancia de estas enzimas en el metabolismo de los disolventes orgánicos y la capacidad de estos disolventes, particularmente el tolueno, de inducir la expresión de CYP2E1.

6. Hemos encontrado una menor expresión del mRNA de CYP2E1 en individuos portadores de alelo variante heterocigoto de CYP2E1*5B y *6 con respecto al homocigoto silvestre. También hemos encontrado una disminución en el nivel de expresión del gen GSTP1 en presencia de las variantes alélicas en el exón 5, así como de los genes GSTM1 y GSTT1 en individuos nulos, en mujeres y en el grupo expuestos. Todo ello indicaría una reducción en la inducibilidad de estas enzimas, en presencia de estos polimorfismos.
7. Existe una disminución en la excreción de los metabolitos mayoritarios del tolueno, xileno y n-hexano, en individuos portadores del alelo variante heterocigotos del CYP2E1*5B con respecto al homocigoto silvestre, así como también una disminución estadísticamente significativa en la excreción de la 2,5-hexanodiona libre en individuos con el genotipo nulo de la GSTM1, con respecto a los portadores del gen.
8. El nivel de expresión de CYP2E1 presentó una disminución significativa al aumentar los años de exposición, lo que podría representar un riesgo para la salud de los trabajadores con mayor antigüedad al estar menos protegidos contra la acción de otros sustratos de la CYP2E1 (como disolventes, alcohol, etc).
9. La tasa de micronúcleos por 1.000 células binucleadas encontrada en la muestra de trabajadores expuestos es significativamente mayor que en controles y mayor en mujeres que en hombres. Esta tasa mostró correlación con las concentraciones urinarias de ácido hipúrico, con las horas de trabajo semanales y con la edad. Todo ello sugiere que la edad, el sexo y las horas de exposición pueden influenciar la inducción del daño citogenético por disolventes en trabajadores del calzado.
10. Todos estos resultados muestran que el efecto combinado de la variabilidad de alelos estudiados para los genotipos de las enzimas CYP2E1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1, junto con el fenotipo medido

mediante la expresión del mRNA específico en muestras de sangre total y la medición del daño citogenético mediante el ensayo de micronucleos, pueden contribuir a explicar las diferencias en la excreción urinaria de los metabolitos de los disolventes orgánicos y la conveniencia de incluir todos estas mediciones en los programas de vigilancia de la salud de los trabajadores expuestos.



7. BIBLIOGRAFÍA



Agency for Toxic substances and Diseases Registry. Toxicological profile for n-hexane. Department for health and human services. (internet). (1999); (citado el 12 de febrero de 2017). 269 páginas. Disponible desde <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp113.pdf>

Agency for Toxic substances and Diseases Registry. Toxicological profile for toluene. Department for health and human services. (internet). (2015); (citado el 10 de febrero de 2017). 516 páginas. Disponible desde <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>

Agency for Toxic substances and Diseases Registry. Toxicological profile for xylene. Department for health and human services. (internet). (2007); (citado el 1 de marzo de 2017). 385 páginas. Disponible desde <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp71.pdf>

Ali-Osman F, Akande N, Mao J. Molecular cloning, characterization and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of 3 human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol. Chem. 1997; 272: 10004-10012

American Conference of Governmental Industrial Hygienists. .Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices (2016). (internet). (citado el 8 de febrero de 2017). Disponible desde <http://www.acgih.org/tlv-bei-guidelines/policies-procedures-presentations/overview>

American Petroleum Institute. Six months continuous inhalation exposure of rats to hexane mixtures. Phase II. (internet). API Medical Research Publication Washington, DC. (1983). (citado el 28 de febrero de 2017). Disponible en <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/OTS00001660.xhtml>

Angel A. Toxicología. Salud y medicina, tecnología (internet). Jul. 2009. (citado el 20 de febrero de 2017). 65 slides. Disponible desde <https://es.slideshare.net/irene17/toxicologia-med>

Andersen I, Lundqvist GR, Mølhav L, Pedersen OF, Proctor DF, Vaeth M, y cols. Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures. *Scand J Work Environ Health*. 1983; 9(5):405-18.

Andersson K, Fuxe K, Nilsen OG, Toftgård R, Eneroth P, Gustafsson JA. Production of discrete changes in dopamine and noradrenaline levels and turnover in various parts of the rat brain following exposure to xylene, ortho-, meta-, and para-xylene, and ethylbenzene. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1981; 60:535-548.

Arana D, Blanco C, Caldes A, Gallego E, Gomez J, Martin P, y cols. "Agentes químicos en el ámbito sanitario".(internet). Escuela Nacional de Medicina del Trabajo (ENMT). Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid 2010 (citado el 1 de marzo de 2017). Disponible en http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-publicaciones-isciii/fd-documentos/ENMT_Monografia_Guia_Agentes_Quimicos.pdf

Arand M, Muhlbauer R, Hengstler J, Jager E, Fuchs J, Winkler L y cols. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal. Biochem*. 1996;236:184–186.

Astrand I, Engström J, Ovrum P. Exposure to xylene and ethylbenzene. I. Uptake, distribution and elimination in man. *Scand. J. Work Environ. Health* 1978; 4:185-194.

Autrup H. Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect*. 1999; 107: 233-238.

Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res*. 2000; 464(1): 65-76.

Bäckstrom B, Dumanski JP, Collins VP. The effect of 2,5-hexanedione on the retina of albino rats. *Neurotoxicol* 1990; 11: 47-56.

Bäckstrom B, Collins VP. The effect of 2,5-hexanedione on rods and cones of the retina of albino rats. *Neurotoxicol*. 1992; 13:199-202

Baelum J, Andersen IB, Lundqvist GR, Mølhave L, Pedersen OF, Vaeth M, y cols. Response of solvent-exposed printers and unexposed controls to six-hour toluene exposure. *Scand J Work Environ Health*. 1985; 11(4):271–280

Baelum J, Mølhave L, Honoré Hansen S, Døssing M. Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans. *Scand J Work Environ Health*. 1993; 19(1):55-62.

Baelum J, Molhave L, Hansen SH, y cols. Metabolic interaction between toluene, trichloroethylene and n-hexane in humans. *Scand J Work Environ Health*, 1998; 24:30-37.

Baker TS, Rickert DE. Dose-dependent uptake, distribution and elimination of inhaled n-hexane in the Fischer-344 rat. *Toxicol. appl. Pharmacol*, 1981; 61: 414-422.

Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J National Cancer Inst*. 1993; 85:1159-1164

Benowitz NL, Peng M, Jacob III P. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2003; 468–474.

Berlin A, Yodaiken RE, Lggan DC. International Seminar on the Assessment of Toxic Agents at the Workplace. Roles of Ambient and Biological Monitoring. *Int. Arch. Occup Environ Health*, 1982, 50, 197-201.

Betancourt G, Da Silva T, Godoy I. Polimorfismo genético relacionado con la probabilidad de desarrollar asma ocupacional en trabajadores expuestos a isocianatos. *Med. Secur. Trab.* (internet) 2014; (citado el 1 de marzo de 2017); 60 (234): 239-259. Disponible desde <http://dx.doi.org/10.4321/S0465-546X2014000100016>

Bhat G, Bhat A, Wani A, Sadiq N, Jeelani S, Kaur R, y cols. Polymorphic variation in glutathione-S-transferase genes and risk of chronic myeloid leukaemia in the Kashmiri population. *Asian Pacific journal of cancer prevention (APJCP)*. 2012; 13 (1): 69-73.

Blanco JG, Harrison PL, Evans WE, Relling MV. Human Cytochrome P450 maximal activities in paediatrics versus adult liver. *Drug, Metabolism and Disposition* 2000; 28(4): 379-382

Bogaards JJP, Van Immen B, Van Bladeren PJ. Interindividual differences in the in vitro conjugation of methylene chloride with glutathione S-transferase in 22 human liver samples. *Biochem Pharmacol*. 1993; 45: 2166-2169.

Bolt HM, Roos PH, Thier R. The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2003; 76:174–185

Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP y cols. Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001; 37: 31-45

Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, cols. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the human micronucleus project. *Mut Res*. 2003; 543: 155-166

Botto F, Seree E, El Khayari R, De Sousa G, Massacrier A, Placidi M, y cols. Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem Pharmacol.* 1994; 48: 1095-1103.

Bouchard C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S. Role of alcohol deshydrogenase 3 and cytochrome P450-E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J. Cancer.* 2000; 87: 734-740.

Brockmüller J, Kerb R, Drakoulis N, Nitz M, Roots I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class μ isoenzymes μ and Ψ in lung cancer patients and controls. *Cancer Research.* 1993; 53(5): 1004-1011.

Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Research.* 1996; 56 (17): 3915–3925

Brusick DJ. An assessment of the genetic toxicity of Atrazine: relevance to health and environmental effects. Ciba Geigy Corporantion (internet). Submitted to EPA. 1988. (citado el 1 de marzo de 2017). Disponible en [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(94)90021-3)

Bus JS, White EL, Tyl RW, Barrow CS. Perinatal toxicity and metabolism of n-hexane in Fischer-344 rats after inhalation exposure during gestation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979; 51: 295-302.

Calvert G, Talaska G, Müller C, Ammenheuser M, Au W, Fajen J y cols. Genotoxicity in workers exposed to methyl bromide. *Mutat. Res.* 1998; 417: 115-128

Campbell L, Wilson HK, Samuel AM. Y cols. Interactions of m-xylene and aspirin metabolism in man. *Br. J. Ind. Health* 1988; 45:127-132

Cardona A, Marhuenda D, Prieto MJ, Marti JB, Periago JF, Sánchez JM. Behaviour of urinary 2,5-hexanedione in occupational co-exposure to n-hexane and acetone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1996; 68:88–93.

Cárdenas-Bustamante O, Varona-Urbe M, Patiño-Florez R, Groot-Restrepo H, Sicard-Suárez D, Tórres-Carvajal M, y cols. Exposición a Solventes Orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá. *Rev. Salud Pública* (internet). 2007; 9 (2): 275-288. (citado el 25 de febrero de 2017). Disponible <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v9n2/v9n2a11.pdf>

Carlone MF, Fouts JR. In vitro metabolism of p-xylene by rabbit lung and liver. *Xenobiotica*, 1974; 4:705-715.

Carl P, Le Bel S, Robert A. Toluene – induced alterations in rat synaptosomal membrane composition and function. *J Biochem Toxicol*. 2006; 3(4): 279-293.

Carlsson A. Distribution and elimination of xylene in rat. *J- Work Environ. Health*, 1981; 7: 51-55.

Carlsson A. Exposure to toluene. Uptake, distribution and elimination in man. *Scand J Work Environ Health* 1982; 8:43-55

Carpenter CP, Kinkead ER, Geary DL Jr, Sullivan LJ, King JM. Petroleum hydrocarbon toxicity studies. V. Animal and human response to vapors of mixed xylenes. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 1975; 33: 543-558.

Cascales Angosto M. Otras monooxidasas microsómicas: las dependientes de flavina. Trimetilaminuria. Monografía XIV, citocromo P450. (internet), Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid 2004.(citado el 14 de febrero de 2017). Disponible en <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/523/541>

Castro R, Ramírez V, Cuenca P. Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev. biol. trop* 2004; 52(3): 611-621.

Chapin RE, Morgan KT, Bus JS. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexadione. *Exp. Mol. Pathol.* 1983; 38, 149-169.

Chen Y, Tseng HS, Kuo WH, Yang SF, Chen DR, Tsai, H. Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Medical Genetics* 2010; 11:46-53.

Cheng TJ, Christiani DC, Xu X, Wain JC, Wiencke KT, Kelsy KT. Glutathione S-transferase μ genotype, diet, and smoking as determinants of sister chromatid exchange frequency in lymphocytes. *Cancer epidemiol. Biomarkers Prev.* 1995; 4: 535-542

Cheng X, Zhang T, Zhao J, Shao H, Zhou Z, Kong F y cols. The association between genetic damage in peripheral blood lymphocytes and polymorphisms of three glutathione S-transferases in Chinese workers exposed to 1,3-butadiene. *Mutation Research* 2013; 750:139-146.

Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y y cols. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 2003; 22:7316–7339.

Clayton G, Clayton F. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. 3rd revised edition. New York, NY: John Wiley & sons. 1981

Dahl AR, Damon EG, Mauderly JL, Rothenberg SJ, Seiler FA, McClellan RO. Uptake of 19 hydrocarbon vapors inhaled by F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1988; 10: 262-269.

De Martino C, Malorni W, Amantini MC, Scorza Barcellona P, Frontali N. Effects of respiratory treatment with N-hexane on rat testis morphology. I. A light microscopic study. *Exp Mol Pathol* 1987; 46:199-216.

Deutsche Forschungsgemeinschaft . Toluene. In: *Critical Data Evaluation for MAK Values and Classification of carcinogens*, 1996; VCH; Vol 7: 257-318,

Dick R, Setzer J, Wait R, Hayden MB, Taylor B, Tolos B, y cols. Effects of acute exposure of toluene and methyl ethyl ketone on psychomotor performance. *Int Arch Occup Environ Health* 1984; 54, 2: 91–109

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 149-173.

Djuric Dusan. Toxicocinética. En: Ellen K. Silbergeld. *Enciclopedia de la salud y seguridad en el trabajo*. 3ª ed. Madrid. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales 2001, p33.8-33.12.

Donato MT. Qué es el Citocromo P450 y cómo funciona. Monografía XIV, citocromo P450. (internet). *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Madrid 2004; (citado el 14 de febrero de 2017).11:32-43. Disponible en <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/515/533>

Echeverria A, Fine L, Langolf G, Schork A, Sampaio C. Acute neurobehavioural effects of toluene. *British Journal of Industrial Medicine* 1989; 46:483-495

Elovaara E, Zitting A, Nickels J, Aitio A. m-Xylene inhalation destroys cytochrome P-450 in rat lung at low exposure levels both after single 1-day and intermittent 5-week treatments. *Arch. Toxicol.* 1987; 61, 21–26

Elovaara E, Engström K, Häyri L, Hase T, Aitio A. Metabolism of antipyrine and m-xylene in rats after prolonged pretreatment with xylene alone or xylene with ethanol, phenobarbital or 3-methylcholanthrene. *Xenobiotica*. 1989; 19:945–960.

Engström K, Husman K, Riihimäki V. Percutaneous absorption of m-xylene in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1977; 39:181-189.

Engström K, Riihimäki V, Laine A. Urinary isposition of ethylbenzene and m-xylene in man follwing separate and combined exposure. *Int Arch Occup Environ Health*. 1984; 54(4):355-63.

Environmental Protection Agency. Toxicological review for n-Hexane. (internet). Integrated risk information system (IRIS). 2005. (Citado el 12 de febrero de 2017). Disponible en https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryID=66053

Environmental Protection Agency. Toxicological review of xylene. (internet). Integrated risk information system (IRIS). 2003. (Citado el 12 de febrero de 2017). Disponible en <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp71-c1.pdf>.

Esplugues S. Utilización de marcadores genéticos en la valoración de riesgos de exposición laboral a estireno mediante control biológico. (tesis doctoral). Alicante. Universidad Miguel Hernández. Facultad de medicina. 2012.

Fenech M, Bonassi S, Turner J, y cols. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2003; 534, 1-2: 45-64

Fenech M, Bolognesi C, Bonassi S, Zeiger E, Knasmuller S, Holland N. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells: A human micronucleus (HUMN) project initiative commencing in 2007. *Mutagenesis*. 2007; 22(1): 3-4.

Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26:43-49.

Fiserová-Bergerova V. Application on toxicokinetic models to establish biological exposure indicators. *Ann Occup Hyg*. 1990; 34: 639-651.

Fisher J, Mahle D, Bankston L, Greene R, Gearhart J. Lactational transfer of volatile chemicals in breast milk. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1997; 58:425-431.

Flores-Hernández C, Páramo D, Huerta-Franco R, Hernández J, Cappacione K, Vargas-Luna M, y cols. Evaluación Psico-Toxicológica de los trabajadores con exposición crónica a solvents orgánicos en las industrias del cuero y del calzado. *Ciencia y Trabajo* 2012; 14 (43): 129-134.

Foo SC, Jeyaratnam J, Koh D. "Chronic neurobehavioural effects of toluene", *Br.J.Ind.Med*. 1990; 47: 480

Foo SC, Ngim CH, Salleh I, Jeyaratnam J, Boey KW. "Neurobehavioural effects in occupational chemical exposure", *Environ. Res*. 1993; 60: 267-273

Fukami T, Katoh M, Yamazaki H, Yokoi T, Nakajima M. Human Cytochrome P450 2A13 Efficiently Metabolizes Chemicals in Air Pollutants: Naphthalene, Styrene, and Toluene *Chem. Res. Toxicol*. 2008; 21:720–725.

Galván CA, Elbarcha OC, Fernández EJ, Beltramo DM, Soria NW. Genetic profiling of GSTP1, DPYD, FCGR2A, FCGR3A and CCND1 genes in an Argentinian population. *Clin Biochem*. 2011; 44(13):1058-1061.

Gamberale F, Annwall G, Hultengren M. Exposure to xylene and ethylbenzene. III. Effects on central nervous functions. *Scand. J. Work Environ. Health* 1978; 4: 204-211.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, y cols. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1239-1248

Gibson JE, Hardisty JF. Chronic toxicity and oncogenicity bioassay of inhaled toluene in Fischer-344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1983; 3: 315-319.

González-Yebra AL, Kornhauser C, Barbosa-Sabanero G, Pérez-Luque EL, Wrobel K. Exposure to organic solvents and cytogenetic damage in exfoliated cells of the buccal mucosa from shoe workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2009; 82:373-380

Gow PJ, Ghabrial H, Smallwood RA, Morgan DJ, Ching MS. Neonatal hepatic drug metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 2001; 88:3-15

Graham DG, Anthony DC, Boekelheide K. In vitro and in vivo studies of the molecular pathogenesis of n-hexane neuropathy. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 1982a; 4: 629-634.

Gut I, Terelius Y, Frantík E, Linhart I, Soucek P, Filipcová B, Klucková H. Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450 2B1 and P450 2E1 in rat liver. *Arch. Toxicol.* 1993; 67: 237-243

Hallier E, Schröder K, Asmuth K, Dommermuth A, Aust B, Goergens H. Metabolism of dichloromethane to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase Theta (GSTT1). *Arch. Toxicol.* 1994; 68: 423-427.

Hastings L, Cooper GP, Burg W. Human sensory response to selected petroleum hydrocarbons. *Adv. Mod. Environ. Toxicol.* 1984; 6: 225-270.

Haufroid V, Toubeau F, Clippe A, Buyschaert M, Gala JL, Lison D. Real time quantification of cytochrome P4502E1 mRNA in human peripheral blood lymphocytes by reverse transcription-PCR: Method and Practical Application. Clin Chem 2001(a); 47: 1126-1129.

Haufroid V, Lison D. Genotyping and phenotyping of metabolic enzymes relevant for the interpretation of biomarkers of exposure. Arch of Public Health. 2002; 60(3-4): 187-202.

Haufroid V, Buchet JP, Gardinal S, Lison D. Cytochrome P4502E1 phenotyping by the measurement of the clorzoxazone metabolic ratio: Assessment of its usefulness in workers exposed to styrene. Int Arch Occup Environ Health. 2002(b); 75: 453-458.

Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphism in the 5' flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. J Biochem. 1991; 110: 559-565.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB). N-hexane. (internet). National Library of Medicine's TOXNET system, 2013. (Citado el 10 de febrero de 2017). Disponible en:

<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~5GWNs5:1>

Hazardous Substances Data Bank (HSDB). XYLENES. (internet). National Library of Medicine's TOXNET system, 2016. (Citado el 12 de febrero de 2017). Disponible en <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~JXxtON:2>

Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, da Silva J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. Toxicology. 2007; 11,232 (3):235-47.

Horowitz, R. Aromatic Hydrocarbons In Clinical Toxicology. Ford M; Delaney, K, Ling L; Erickson T Eds. W.B Saunders. Philadelphia. 2001: 803-812

Houlston RS. Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: A meta- analysis. *Cancer Epidem. Biomarkers and Prevention.*1999; 8: 675-682

Howard LA, Micu AL, Sellers EM, Tyndale RF. Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 299:542–550

Iba M, Fung J, Gonzalez J. Functional Cyp2e1 is required for substantial in vivo formation of 2,5-hexanedione from n-hexane in the mouse. *Arch Toxicol.* 2000; 74: 582-586

Ikeda M, Hirayama T. Possible metabolic interaction of styrene with organic solvents. *Scand J Work Environ & Health.* 1978; 4(2): 41-46.

Imbriani M, Ghittori S, Pezzagno G. n-hexane urine elimination and weighted exposure concentration. *Int Arch Occup Environ Health*, 1984; 55:33-41.

Inoue O, Seiji K, Kawai T, Watanabe T, Jin C, Cai SX y cols. Excretion of methylhippuric acids in urine of workers exposed to a xylene mixture: Comparison among three xylene isomers and toluene. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993; 64:533-539.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del n-hexano. DLEP 36. 2007.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del tolueno. DLEP 39. 2007.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional de los isómeros de xilenos. DLEP 53. 2011.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2016. Generalitat Valenciana. Consellería d'Economia, Hisenda i Ocupació. Valencia 2016.

International Agency for Research on Cancer, Xylenes. Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans (monographs) 1999; 71: 1189-1208. (consultado el 1 de marzo de 2017). Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-58.pdf>

Iregren A. Effects on psychological test performance of workers exposed to a single solvent (toluene). A comparison with effects of exposure to a mixture of organic solvents, Neurobehav. Toxicol. Teratol. 1982; 4: 695-701.

Jacobson GA, McLean S. Biological Monitoring of Low Level Occupational Xylene Exposure and the Role of Recent Exposure Ann Occup Hyg 2003; 47 (4): 331-336.

Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. Mutat Res 2001; 491: 9-16

Jang JH, Cotterchio M, Borgida A, Gallinger S, Cleary SP. Genetic variants in carcinogen-metabolizing enzymes, cigarette smoking and pancreatic cancer risk. Carcinogenesis. 2012; 33(4): 818-827.

Jenner P. Oxidative mechanism in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov Disord. (1998); 13: 24-34.

Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, Oliveira J, Bento MJ, Silva C, y cols. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2002; 11,445-450.

Jia W, Sun JY, Jia KY, Liu XC. Role of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile 105Val gene polymorphisms in the response to chemotherapy and overall survival of advanced non-small cell lung cancer. *Genet. Mol. Res* 2016; 15(3). doi: 10.4238/gmr.15037668

Jiménez-Garza O, Márquez-Gamiño S, Albores A, Caudillo-Cisneros C, Carrieri M, Bartolucci GB, y cols. CYP2E1 phenotype in Mexican workers exposed to low levels of toluene. *Toxicol let.* 2012; 210: 254-263

Jorgensen N, Cohr K.-H. n-hexane and its toxicologic effects: A review. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 1981;7 (3):157–168

Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Horiguchi S, Morioka I, Miyashita K, y cols. Monitoring of workers exposed to a mixture of toluene, styrene and methanol vapours by means of diffusive air sampling, blood analysis and urinalysis. *Int Arch Occup Environ Health*. 1992; 63: 429-435.

Kawamoto T, Koga M, Murata K, Matsuda S, Kodama Y. Effects of LDH2, CYP1A1, and CYP2E1 genetic polymorphisms and smoking and drinking habits on toluene metabolism in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995; 133:295-304.

Khayat C, Alves-Costa E, Gonçalves M, da Cruz D, Silva A, Oliveira de Araujo C, y cols. Assessment of DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. *Environ Sci Pollut Res* 2013; 20:7334–7340.

Kim YD, Eom SY, Zhang YW, Kim H, Park JD, Yu SD, y cols. Modification of the relationship between urinary 8-OHdG and hippuric acid concentration by GSTM1, GSTT1, and ALDH2 genotypes. *Hum Exp Toxicol*. 2011; 30(4):338-42. Citado el 1 de marzo de 2017.

Disponibile en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488846> .

Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res.* 2002; 504(1-2):137-48.

Klaassen C. Distribution, excretion and absorption of toxicants. En Casarett and Douu's. *Toxicology. The basic science of poisons.* Ed. Macmillan Publishing Company. Tercera Edición. New York. 1986; 33-63.

Klaassen CD, Watkins J. *Manual de Toxicología* 5ª ed. Mexico D. F. McGraw hill interamericana editores 2001.

Knudsen L, Norppa H, Sabro Nielsen P, Okkels H, Autrup H. Genotoxic damage in Danish busdrivers. *Mutat. Res.* 1997; 379: S114, suppl. I

Kordi-Tamandani DM, Hashemi M, Birjandian E, Bahari A, Valizadeh J, Torkamanzehi A. Lack of association of GSTT1 and GSTP1 genes methylation and their expression profiles with risk of NAFLD in a sample of Iranian patients. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2011a; 35: 387–392.

Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, y cols. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and myc rearrangemenst in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998; 92(9): 3152-3162.

Krasavage WJ, O'Donoghue JL, DiVincenzo G. The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 52:433-441.

Laffon B, Pérez-Cadahía B, Pasaro E, Méndez J. Individual sensitivity to DNA damage induced by styrene in vitro: influence of cytochrome P450, epoxide hydrolase and glutathione S-transferase genotypes. *Toxicology.* 2003; 186, (1–2): 131–141.

Laffon B, Pérez B, Méndez J. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. Anales Real Academia Nacional de Farmacia. 2004; 70(1): 95-123.

Landi S, Lazzolino E, Barale R. Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values? Mutat Res 2000; 469: 159-166

Lauwerys R. Industrial chemical exposure: guidelines for biological monitoring. Biochemical Publications. Davis. California. 1983.

Lauwerys R, Bernard A. Biological monitoring of toxic chemical: The present position and perspectives of development. Scand J of Work, Environment and Health. 1985; 11: 155-164.

Lauwerys R. Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Barcelona. Ed. Masson. 1994. 631 paginas.

Leung H. Use of physiologically based pharmacokinetics models to establish biological exposure indices. Am Ind Hyg Assoc J. 1992; 53: 369-374.

Leung HW, Paustenbach DJ. Application of pharmacokinetics to derive biological exposure indexes from threshold limit values. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1988; 49 (9): 445-450

Lieber CS. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. Physiol.Rev. 1997; 77: 517–544.

Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) a review. Alcohol Clin Exp Res. 1999; 23(6):991–1007.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods. 2001; 25: 402-408.

Löf A, Wigaeus Hjelm E, Colmsjö A, Lundmark B, Norström Å, Sato A. Toxicokinetics of Toluene and Urinary Excretion of Hippuric Acid after Human Exposure to 2H8-Toluene. *British Journal of Industrial Medicine* 1993; 50 (1): 55-59

Löf A. Toxicokinetics of organic solvents: A review of modifying factors. *Critical Reviews in Toxicology*, 1998; 28(6): 571-650.

Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44:723–738.

Lucas D, Menez C, Girre C, Berthou F, Bodenez P, Joannet I, y cols. Cytochrome P450E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 298-304.

Lucas D, Ferrara R, González E, Bodenez P, Albores A, Manno M, y cols. Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics*. 1999; 9: 377-388.

Lucas D, Ferrara R, González E, Bodenez P, Albores A, Manno M, y cols. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicol. Lett*. 2001; 124:71-81

Lucero L, Pastor S, Suárez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T y cols. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 2000; 464: 255-262

Maffei F, Angelini S, Forti GC, Lodi V, Violante FS, Mattioli S y cols. Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis* 2002; 17: 405-409

Mancheño MC, Izquierdo MA. Exposición laboral a disolventes. Cáncer 0 en el trabajo. Unión Sindical de Madrid Región de CCOO. Fundación para la Prevención de Riesgos Laborales. Madrid 2008.

Mapp C, Fryer A, De Marzo N, Pozzato V, Padoan M, Boschetto P, y cols. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002; 109(5): 745-746.

Marhuenda D, Prieto MJ, Cardona A, Roel JM, Oliveras MA. Adaptación transcultural y validación de la versión española del EUROQUEST. *Neurología*, 2014; 30(4): 201-207.

Mendoza-Cantú A, Castronera-Torres F, Bermúdez de León M, Cisneros B, López-Carrillo L, Rojas-García AE, y cols. Occupational toluene exposure induces Cytochrome P450 2E1 mRNA expression in peripheral Lymphocytes. *Environ Health Persp*, 2006; 114(4): 494-498.

Mercado CF. Nuevos datos sobre la toxicocinética del tolueno para el monitoreo biológico de la exposición ocupacional. *Revista Latino Americana de la Salud en el Trabajo*, 2004; 4 (2): 52-55

Migliore L, Guidotti P, Favre C, Nardi M, Sessa MR, Brunori E. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat Res* 1991; 263: 243-248

Miller DP, Asomaning K, Liu G, et al. An association between glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and younger age at onset of lung carcinoma. *Cancer*. 2006; 107(7):1570–1577.

Morohashi KI, Sadano H, Okada Y, Omura T. Position specificity in n-hexane hydroxylation by two forms of cytochrome P-450 in rat liver microsomes. *Journal of Biochemistry*, 1983; 93 (2): 413-419.

Mostafa AM, Abdel-Naim AB, Abo-Salem O, Abdel-Haziz AH, Hamada FM. Renal metabolism of acrylonitrile to cyanide: in vitro studies. *Pharmacol Res.* 1999; 40: 195-200.

Mugford CA, Kedderis GL. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 1998; 30(3):441-98.

Mukanganyama S, Masimiremdwa CM, Naik YS, Hasler JA. Phenotyping of the glutathione S-transferase M polymorphism in Zimbabweans and the effects of chloroquine on blood glutathione S-transferases M1 and A. *Clin Chem Acta.* 1997; 265: 145-155.

Mutti A, Falzoi M, Lucertini S, Arfini G, Zignani M, Lombardi S, y cols. n-Hexane metabolism in occupationally exposed workers. *Br. J. ind. Med.* 1984; 41: 533-538.

Naccarati A, Soucek P, Stetina R, Haufroid V, Kumar R, Vodickova L y cols. Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res.* 2006; 593(1-2):22-31.

Nakajima T, Wang RS. Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int J Biochem* 1994; 26:1333-1340

Nakajima T. Cytochrome P450 Isoforms and the Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass. *J Occup Health* 1997; 39: 83–91

Nakamura K, Iwahashi K, Ameno K, Sekine Y, Suzuki K, Minabe Y, y cols. CYP2E1 and clinical features in alcoholics. *Neuropsychobiology.* 2003; 4(2): 86-89.

National Institute for Occupational Safety and Health. Manual of Analytical Methods. U.S. Department of Health, education and welfare. Cincinnati OH 2^a Ed. 1977.

Neubert D, Gericke C, Hanke B, Beckman G, Baltes MM, Kühl KP, y cols. Multicenter field trial on possible health effects of toluene. II. Cross-sectional evaluation of acute low-level exposure. *Toxicology*, 2001;168:139-183.

Ng TP, Foo SC, Yoong T. Risk of spontaneous abortion in workers exposed to toluene. *Br. J. Indust. Medicine* 1992; 49:804-808

Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters* 2004,149:309-334.

Obiols J. Control Biológico de los trabajadores expuestos a contaminantes químicos. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. Barcelona, 1998.

Obiols J., Guardino X. NTP 586: Control biológico: concepto, práctica e interpretación. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. Barcelona 2001.

Ogata M, Tomokuni K, Takasuka Y. Urinary excretion of hippuric acid and m- or p-methyl hippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. *Br. J. Ind. Health* 1970; 27: 43-50.

Ogata M, Yamasaki Y, Meguro T, Sugihara R, Shimada Y. Quantitation of urinary o-xylene metabolites in rats and human beings by high-performance liquid chromatography. *Ind Health*,1979; 17:123-125.

Olson BA, Gamberale F, Iregren A. Co-exposure to toluene and p-xylene in man: central nervous functions. *Br. J. Ind. Med.* 1985; 42:117-122.

OMS. Serie de Informes Técnicos "Límites Recomendados por Razones de Salud en la Exposición Profesional de Determinados Solventes Orgánicos". N° 664. 1992:10-25.

Ono Y, Takeuchi Y, Hisanaga N. A comparative study on the toxicity of n-hexane and its isomers on the peripheral nerve. *Int Arch Occup Environ Health*, 1981; 48:289-294.

Orbaek P, Nise G. Neurashenic complaints and psychometric function of toluene-exposed rotogravure printers. *Am. J. Ind. Med.* 1989; 16: 67-77.

ORDEN PRE/2743/2006, de 5 de septiembre, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (tolueno y triclorobenceno). (Boletín Oficial del Estado núm. 214, de 7 de septiembre de 2006), (páginas 31882 a 31883)

Orellana M, Guajardo V. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Revista Médica Chilena* 2004; 132 (1): 85-94

Organización de las Naciones Unidas. Protocolo de Montreal, relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono. Convenio de Viena para la protección de la capa de Ozono Negociado 1987. 7ª edición, 2006

Organización Internacional del Trabajo. Enciclopedia de Seguridad y Salud en el Trabajo. Cuarta Edición. Vol 4. Guías de productos químicos 104.275. 1998.

Occupational Safety and Health Administration. Guideline for Xylene. Department of labor. Occupational Safety and Health. United States. 1978.

Palmer JL, Scott RJ, Gibson A, Dickins M, Pleasance S. An interaction between the cytochrome P450 probe substrates chlorzoxazone (CYP2E1) and midazolam (CYP3A4). *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 52: 555-561.

Pastore C, Izura V, Marhuenda D, Prieto MJ, Roel J, Cardona A. *Muscle Nerve* 2002; 26: 132-135

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, y cols. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994; 300(1): 271-276.

Perbellini L, Brugnone F, Faggionato G. Urinary excretion of the metabolites of n-hexane and its isomers during occupational exposure. *Brit J Indust Med* 1981; 38:20-26.

Perbellini L, Bartolucci GB. 2,5-Hexadione in the biological monitoring of occupational exposure n-hexane. *Med. Lav.*, 1985; 76: 35-43

Perbellini L, Mozzo P, Brugnone F. Physiologicomathematical model for studying human exposure to organic solvents: kinetics of blood/tissue n-hexane concentrations and of 2,5-hexanedione in urine. *British J. Ind Med* 1986; 43:760-768.

Perbellini L, Marhuenda D, Cardona A, Giuliari C, Brugnone F. An improved method of analysing 2,5-hexanedione in urine. *British J. Ind. Med.* 1990; 47: 421-424.

Perbellini L, Pezzoli G, Brugnone F, Canesi M. Biochemical and physiological aspects of 2,5-hexanedione: Endogenous or exogenous product? *Int Arch Occup Environ Health*, 1993; 65 (1): 49-52

Pérez LE, Miranda VE. Determinación de fenoles, ácido hipúrico y ácido metilhipúrico en orina como indicadores biológicos de exposición al Benceno, Tolueno y Xileno en trabajadores expuestos en una fábrica de caucho en Lima Metropolitana. (Tesis doctoral). Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.

Peter R, Bocker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang C.S. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450 IIEI. *Chem. Res. Toxicol.*, 1990; 3:566-573.

Pezzoli G, Ricciardi S, Masotto C. n-hexane induces parkinsonism in rodents. *Brain Res* 1990; 531:355-357.

Piccoli P, Carriere M, Padovano L, Di Mare M, Bartolucci GB, Fracasso ME, y cols. In vivo CYP2E1 phenotyping as a new potential biomarker of occupational and experimental exposure to benzene, *Toxicology Letters* 2010; 192: 29–33

Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, y cols. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research*, 1999; 441(1): 115-27.

Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Pavlova S, Petkova V, Hirvonen A, y cols. Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(4):399-404.

Prado C, Tortosa JA, Ibarra I, Periago JF. Biological monitoring of occupational exposure to isoflurane by measurement of isoflurane exhaled breath. *J Appl Toxicol.* 1997; 17: 179-183.

Prieto MJ, Cardona A, Marhuenda D, Roel J, Corno A. Use of genotype and phenotype for the biological monitoring of occupational exposure to styrene. *Toxicol Lett* 2010; 192 (1): 34-39.

Proctor NH, Hughes JP, Fischman ML. *Chemical Hazards of the Workplace.* Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Company, 1988; 229-231

Pryor GT, Bingham LR, Dickinson J, Rebert CS, Howd RA. Importance of schedule of exposure to hexane in causing neurotoxicity. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1982; 4: 71-78.

Raucy JL, Kraner JC, Lasker JM. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome p-450E1. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23: 1-20.

Raucy JL, Curley G, Carpenter SP. Use of lymphocytes for assessing ethanol-mediated alterations in the expression of hepatic cytochrome CYP2E1. Alcohol Clin Exp Res. 1995; 19: 1369-1375.

Raucy JL, Schultz ED, Wester MR, Arora S, Johnston DE, Omaahl JL, y cols. Human lymphocyte cytochrome CYP2E1, a putative marker for alcohol mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity. Drug Metab Dispos. 1997; 25: 1429-1435.

Raucy JL, Schultz ED, Kearins MC, Arora S, Johnston DE, Omdahl JL y cols. CYP2E1 expression in human lymphocytes from various ethnic populations. Alcohol Clin Exp Res. 1999; 23: 1868-1874.

Raunio H, Liira J, Elovaara E, Pelkonen O. Citocromo P450 inducción de la isoenzima por metileticetona y m-xileno en hígado de rata. Toxicología y Farmacología Aplicada 1990; 103: 175-179.

Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. (Boletín Oficial del Estado núm. 278, de 20 de noviembre de 1989), (páginas 36363 a 36365).

Real Decreto 374/2001, de 6 de abril sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. (Boletín Oficial del Estado núm 104, de 1 de mayo de 2001), (páginas 15893 a 15899).

Real Decreto 117/2003, de 31 de enero, sobre limitación de emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes en determinadas actividades. (Boletín Oficial del Estado núm. 33 de 07 de Febrero de 2003) (páginas 5030-5041).

Rennenberg Reinhard. Biotecnología para principiantes. Barcelona Editorial Reverté. 2008.

Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors Drug Metabolism Reviews, 1997; 29 (1-2): 413-580

Revilla A. Cambios inducidos por tolueno y xileno en el estado energético y oxidativo de mitocondrias aisladas [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008

Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. Hum. Mol. Genet. 1993; 2 (2):159–163

Riihimäki V, Pfäffli P. Percutaneous absorption of solvent vapours in man. Scand.J. Work Environ. Health 1978; 4: 73-85.

Riihimäki V, Pfäffli P, Savolainen K, Pekari K,. Kinetics of m-xylene in man. General features of absorption, distribution, biotransformation and excretion in repetitive inhalation exposure. Scand. J. Work Environ. Health 1979; 5: 217-231

Riihimäki V, Savolainen K. Human exposure to m-xylene. kinetics and acute effects on the central nervous system. Ann. Occup. Hyg. 1980; 23: 411-422

Riihimäki V, Savolainen K, Pfaffili P. Metabolic interactions between m-xylene and ethanol. Arch. Toxicol. 1982; 49: 253-263.

Roberts L, Vemot E, Bevan C, Bui Q, Koschier F, Panson R, y cols. Developmental toxicity of toluene in the rat. Teratology, 1993; 47: 434-439

Robertson PJr, White EL, Bus J. Efectos del pretratamiento de metil etil cetona sobre la oxidasa hepática de función mixta y en el metabolismo in vivo del n-hexano Xenobiotica 1989; 19: 721-729.

Rossini A, Soares S, Rapozo D, Faria M, Albano RM, Ribeiro LF. *CYP2A6* and *CYP2E1* polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res*, 2006; 39(2) 195-201.

Rudolph A, Hein R, Hoffmeister M, Försti A, Hemminki K, Risch A, y cols. Copy number variations of *GSTT1* and *GSTM1*, colorectal cancer risk and possible effect modification of cigarette smoking and menopausal hormone therapy. *Int J Cancer*. 2012; 131: E841-E848.

Rueff J, Teixeira J, Silva Santos L, Gaspar JF. Genetic effects and biotoxicity monitoring of occupational styrene exposure. *Clinica Chimica Acta*. 2009; 399: 8-23

Ruiz LK, Márquez S, Carriera M, Jiménez-Garza O. Efecto ototóxico de n-hexano y etilbenceno en personas con exposición laboral a mezclas de compuestos orgánicos volátiles (COV). *Acta Universitaria*, 2014; 24:73-77

Ryberg D, Skaug V, Hewer A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997; 18:1285-1289

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

Sato A, Nakajima T. Differences following skin or inhalation exposure in the absorption and excretion kinetics of trichlorethylene and toluene. *Br J Ind Med*, 1978; 35:43-49.

Savolainen H, Vainio H, Helojoki M, Elovaara E. Biochemical and toxicological effects of short-term, intermittent xylene inhalation exposure and combined ethanol intake. *Arch Toxicol*. 1978; 41:195–205.

Savolainen K, Riihimäki V, Linnoila M. Effects of short-term exposure on psychophysiological functions in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1979; 44: 201-211.

Savolainen H, Pfaffli P. Dose dependent neurochemical changes during short term inhalation exposure to m-xylene. *Arch. Toxicol.* 1980; 45:117-122

Savolainen, K. Riihimäki V, Seppäläinen AM, Linnoila M. Effects of short-term m-xylene exposure and physical exercise on the central nervous system. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1980(a); 45: 105-121.

Savolainen K, Riihimäki V, Vaheri E, Linnoila M. Effects of xylene and alcohol on vestibular and visual functions in man. *Scand. J. Work Environ. Health*, 1980(b); 6: 94-103.

Savolainen K, Riihimäki V. An early sign of xylene effect on human equilibrium. *Acta Pharmacol. Et Toxicol.* 1981; 48: 279-283.

Sedivec V, Flek J. The absorption, metabolism and excretion of xylenes in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1976; 37: 205-217.

Segado A, Dorrego S, Bañares R, Álvarez E, Bandres F, Gómez-Gallego F. Genetic susceptibility to the development of acute alcoholic hepatitis: role of genetic mutations in dehydrogenase alcohol, aldehyde dehydrogenase and cytochrome P450 2E1. *Rev Clin Esp* 2005; 205:528-532

Selgrade MK, Daniels MJ, Jaskot RH, Robinson BL, Allis JW. Enhanced mortality and liver damage in virus-infected mice exposed to p-xylene. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1993; 40:129–144

Shimada T, Yamzaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome p-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 270: 414-423.

Silva JM, Santos-Mello R. Chromosomal aberrations in lymphocytes from car painters. *Mutation Research*, 1996; 368: 21-25

Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research*, 1990; 237:123-130.

Smith B, Plummer J, Wolf C. p-Xylene metabolism by rabbit lung and liver and its relationship to the selective destruction of pulmonary cytochrome P-450. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; 223: 736-742.

Song BJ. Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20 (8 Suppl):138A-146A

Spencer PS, Schaumburg HH. Degeneration in central and peripheral nervous systems produced by pure n-hexane. An experimental study. *Brain* 1976; 99(2):183-192

Stewart R D, Hake CL, Forster HV, Lebrun AJ, Peterson JE, Wu A. Toluene: development of a biologic standard for the industrial worker by breath analysis, (internet) DHEW- NIOSH report 99-72-84, 2012. (citado el 20 de febrero de 2017). Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb10888e0007/pdf>

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*. 2001; 482: 21-26.

Streetman DS, Butino JS, Nafziqer AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000 ;10(3):187-216

Subramanian U, Ahmed AE. Intestinal toxicity of acrylonitrile: in vitro metabolism by intestinal cytochrome P4502E1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995; 135: 1-8.

Sugimura T, Kumimoto H, Tohnai I, Fukui T, Matsuo K, Tsurusako S, y cols. Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35: 11-18.

Sun F, Tsuritani I, Honda R, Ma ZY, Yamada Y. Association of genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes with excessive alcohol consumption in Japanese men. *Hum Genet,* 105 (1999), pp. 295-300

Tan H, Wang Q, Wang A, Ye Y, Feng N, Feng X, y cols. Influence of GSTs, CYP2E1 and mEH polymorphisms on 1,3-butadiene-induced micronucleus frequency in Chinese workers. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2010; 247: 198-203.

Testa A, Festa F, Ranaldi R, et al. A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environ Mol Mutagen.* 2005; 46:182–188

Thier R, Bolt HM. The new era of toxicology. *Trends Pharmacol Sci.* 2001: 22: 549-550.

Thier R, Golka K, Brüning T, Ko Y, Bolt HM. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and epidemiological studies in the development of new toxicological concepts. *Toxicol. Lett.* 2002; 127: 321-327.

Thier R, Brüning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human and environmental hygiene and toxicology. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2003; 206 (3): 149–171.

Toftgård R, Nilsen OG. Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome p-450 and in vitro enzymatic activities in rat liver, kidney and lung. *Toxicology*. 1982; 23:197–212.

Torres C, Varona M, Lancheros A, Patiño R, Groot H. Evaluación del daño en el AND y vigilancia biológica de la exposición laboral a solventes orgánicos 2006. *Biomédica* 2008; 28: 126-138

Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML. Utility micronucleus test and nuclear abnormalities in exfoliated cells of oral mucosa in the evaluation of genotoxic and cytotoxic damage. *Int. J. Morphol* 2013; 31(2):650-657.

Truchon G, Tardif R, Brodeur J. Gas Chromatographic determination of urinary O-cresol for the monitoring of toluene exposure. *J. Analyt. Toxicol.*1996; 20 (5):309-312

Tsuruta, H. Percutaneous absorption of organic solvents. III. On the penetration rates of hydrophobic solvents through the excised rat skin. *Ind. Health*, 1982; 20: 335-345.

Tsutsumi M, Lasker JM, Takahashi T, Lieber CS. In vivo induction of hepatic P450E1 by etanol: role of increased enzyme synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 304:209-218

Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, Abe T, Sagami I, Ohmachi T, y cols. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450E1 gene and susceptibility to lung cancer. *J Cancer Res.* 1991; 82: 254-256.

Uematsu F, Kikuchi H, Ohmachi T, Sagami I, Motomiya M, Kamataki T y cols. Two common RFLPs of the human CYP2E gene. *Nucl Acids Res.* 1991b; 19; 2803-2803

Ulusoy G, Arinç E, Adali O. Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. *Arch Toxicol.* 2007; 81(10):711-718.

Uuksulainen SO, Heikkilä PR, Olkinuora PS, Kiilunen M. Self-reported occupational health hazards and measured exposures to airborne impurities and noise in shoe repair work. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2002; 8 (4): 320-327

Van Thriel C, Kleinsorge T, Zupanic M, Seebe A. Switching - attention additional aspects for the analysis. *Neuro Toxicology*, 2000; 21: 795-804

Vieira I, Pasanen M, Raunio H, Cresteil T. Expression of CYP2E1 in human lung and Kidney during development and in full-term placenta: a differential methylation of the gene is involved in the regulation process. *Pharmacol Toxicol.* 1998; 83:183-187.

Villard PH, Seree EM, Re JL, De Meo M, Barra Y, Attolini L, y cols. Effects of tobacco smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e, and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998; 148:195–204.

Veulemans H, Van Vlem E, Janssens H, Masschelein R, Leplat A. Experimental human exposure to n-hexane. Study of the respiratory uptake and elimination, and of n-hexane concentrations in peripheral venous blood. *Int. Arch. occup. environ. Health*, 1982; 49: 251-263.

Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, y cols. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQ01, GSTM1 and GSTT1 genes with benzene, poisoning. *Environ Health Persp.* 2002; 110(12): 1213-1218

Wang W, Qiu YL, Jiao J, Liu J, Ji F, Miao WB, Zhu Y, Xia ZL. Genotoxicity in vinyl chloride-exposed workers and its implication for occupational exposure limit. *Am J Ind Med.* 2011; 54(10):800-10. doi: 10.1002/ajim.20990.

Wang Y, Yang H, Li L, Wang H, Zhang C, Yin G, Zhu B. Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: A meta-analysis. *European Journal of cancer*. 2010; 46(4): 758-764.

Waritz RS. Biological indicators of chemical dosage and burden. En Cralley, L.J., Cralley, L.V, Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 2ªedición. New York, Ed. John Wiley & sons. 1985; Vol 3B.

Wheeler C, Wrighton S, Guenther T. Detection of human lung cytochromes P450 that are immunochemically related to cytochrome P450IIE1 and cytochrome P450IIIA. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 183–186

Wilkins-Haug L, Gabow PA. Toluene abuse during pregnancy: obstetric complications and perinatal outcomes. *Obstet. Gynecol.* 1991; 77:504-50.

World Health Organisation. Air quality Guidelines: Toluene second edition. 2000 (internet). Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark. (citado el 11 de febrero de 2017). Disponible desde http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf

World Health Organisation. Toluene. 2000 (internet). Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark. (citado el 11 de febrero de 2017). Disponible desde http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/123068/AQG2ndEd_5_14Toluene.PDF

Yano H, Tsutsumi M, Fukura M, Chen WB, Shimanaka K, Tsuchishima M, y cols. Study of cytochrome P4502E1 m RNA level of mononuclear cells in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25: 2S-6S.

Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005; 28:227-236.

Zhang Y, Liu Q, Duan H, Cheng J, Jiang S, Huang X, y cols. Association between metabolic gene porlimorphisms and susceptibilitiy to peripheral nerve damage in workers exposed to n-hexane: a preliminary study. *Biomarkers*, 2006; 11 (1): 61-69

Zhou GW, Hu J, Li Q. CYP2E1 PstI/ RsaI polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(23): 2949-2953.



8. ANEXOS



ANEXO I: HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO

Título del estudio: DETERMINACION DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO

Le invitamos a participar en un estudio de investigación DETERMINACION DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO realizado por el grupo de investigación "Medicina Legal y Laboral" de la Universidad Miguel Hernández y patrocinado por el Instituto de Salud Carlos III. Esta hoja de información describe en qué consiste el estudio, por lo que le rogamos la lea detenidamente antes de confirmar su participación. Por favor plantee al médico o al personal del estudio cualquier pregunta o cuestión que no entienda de esta hoja de información.

Objetivos del estudio

Es un estudio en el que se trata de obtener en voluntarios trabajadores del calzado sanos con riesgo químico por exposición a disolventes orgánicos en su trabajo (n-hexano, tolueno, acetona, MEK, etc) diferentes indicadores del nivel de exposición a los mismos. El objetivo es estudiar algunas enzimas responsables de la transformación de tóxicos orgánicos en el organismo (en particular, sus genotipos y fenotipos) y relacionar los datos obtenidos con los indicadores biológicos de los disolventes habitualmente utilizados en los programas de vigilancia de la Salud Laboral. Estos datos serán luego analizados mediante ordenador para poder obtener resultados y conclusiones. Para ello estudiaremos a personas sanas expuestas a disolventes y a personas sanas no expuestas.

Procedimiento del estudio

El estudio se realizará sobre trabajadores en activo, seleccionados de empresas del calzado, y dentro de éstas a los trabajadores que manipulan disolventes orgánicos en el proceso de producción. Estos trabajadores están, por tanto expuestos a disolventes en mayor o menor medida en función de sus condiciones de trabajo particulares. A los trabajadores no se les somete a exposición adicional a ningún agente nocivo, la exposición que se mide es la que ellos presentan como consecuencia de su actividad laboral habitual. También se estudiarán una muestra del mismo número de

trabajadores del mismo rango de edad y sexo y sin historia de exposición laboral a tóxicos, que se utilizará como grupo control.

El protocolo previsto para la ejecución del estudio consistirá en la evaluación higiénica del puesto de trabajo, la recogida de datos laborales y médicos que permitan detectar parámetros de inclusión/exclusión en el estudio, y la toma de muestras biológicas para la determinación de las variables objeto de estudio. La recogida de estas muestras se llevará a cabo dentro del protocolo de los exámenes de salud que se realizan anualmente por el médico del trabajo del Servicio de Prevención correspondiente, previa información al trabajador y mediante la firma del correspondiente consentimiento informado. El tipo de muestras que se les recogerá son orina, sangre y mucosa bucal, mediante procedimientos inocuos y por el mismo personal que realiza la extracción en el examen de salud. Las muestras serán analizadas en el laboratorio de Toxicología Laboral y Forense del Departamento de Patología y Cirugía de la Universidad Miguel Hernández. Las variables analíticas que se obtendrán son: a partir de las muestras de mucosa bucal, los estados genotípicos de los principales genes polimórficos de las principales enzimas que intervienen en la metabolización de los disolventes más utilizados en el calzado (CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1); a partir de las muestras de sangre, la expresión génica de dichas enzimas mediante la cuantificación del mRNA específico y la determinación del posible efecto citogenético mediante el test de micronúcleos; y a partir de las muestras de orina los niveles de los indicadores biológicos de los disolventes orgánicos (n-hexano, toluenos, MEK, acetona, etc) a los que están expuestos los trabajadores (2,5-hexanodiona, ácido hipúrico, MEK, acetona, etc en orina, respectivamente). Los datos personales que se manejarán serán los sociodemográficos y algunos de los incluidos en la historia clínica laboral a la que accede el médico del trabajo y que se utilizarán para detectar parámetros (hábitos tóxicos, IMC, patologías previas) que puedan influir en los resultados que se pretenden obtener y/o desaconsejen la inclusión del trabajador en el estudio.

Riesgos

La muestra de orina se recogerá en frasco estéril de poliestireno idéntico al utilizado para los análisis rutinarios de orina y que será facilitado al trabajador durante el reconocimiento médico. La extracción de la muestra de mucosa bucal se realizará por el profesional sanitario mediante frotis de mejilla utilización de una torunda de algodón

estéril (Dacron, eurotubo collection swab). Ambas intervenciones no comportan ningún riesgo para el trabajador.

La muestra de sangre se recogerá a partir de la misma punción del antebrazo practicada por el profesional sanitario para la realización del análisis de sangre (hemograma y bioquímica) que se realiza rutinariamente en el reconocimiento médico por lo que no supone tampoco para usted ningún riesgo añadido al de la punción que se ha de realizar para recoger la muestra en el examen de salud. En cualquier caso, los riesgos que comportan la punción venosa podría ser levemente dolorosa o aparecer un hematoma.

Beneficios

No existe ningún beneficio particular para usted por el hecho de participar en el estudio. No obstante le serán facilitadas, a través de su médico del trabajo y con carácter absolutamente confidencial, los niveles que usted presenta de los indicadores biológicos utilizados en los programas de vigilancia de la Salud Laboral para evaluar la exposición a los disolventes orgánicos que manipula en su trabajo. También tendrá derecho a conocer con la misma confidencialidad los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

Además la información que se obtenga a partir de los resultados del estudio podría ser útil para proteger la salud y evitar la aparición de daños en la salud de trabajadores con riesgo químico por exposición a disolventes orgánicos, mediante la identificación de nuevos marcadores biológicos de estimación del riesgo, que puedan ser utilizados en los programas de Vigilancia de la Salud como estrategia preventiva.

Participación

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Si usted decidiera participar podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar ninguna explicación y sin perjuicio alguno. Si usted desea abandonar su participación en el estudio, por favor, notifíquesele a su médico del trabajo. No existen compensaciones o pagos por su participación. Se respeta lo establecido en el Real Decreto 223/2004 (art. 12.5) sobre menores de edad, inhábiles o legalmente incapaces.

Confidencialidad

El acceso a sus datos clínico-laborales se realizará guardando la más estricta confidencialidad de forma que no se viole la intimidad personal de los sujetos participantes en el mismo. Sus datos y muestras serán objeto de un tratamiento disociado, de modo que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o identificable.

Sus datos serán tratados de forma anónima en todo el desarrollo de la investigación y posteriormente a la misma. El equipo médico que le atiende recogerá la información acerca de usted y anotará sus datos de acuerdo a un código sin poner su nombre. Todos los datos que se recojan y se introduzcan en una base de datos se mantendrán confidenciales. El Investigador, cuando procese y trate sus datos tomará las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados. Los resultados que se obtengan de este estudio pueden aparecer en un informe final del mismo o en revistas científicas. Sin embargo su nombre no aparecerá en ningún informe o publicación. Usted puede revocar en cualquier momento el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales.

El estudio cumple con los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (59ª Asamblea Médica Mundial), en el Convenio del Consejo Europeo relativo a los derechos humanos y la biomedicina, así como con los requisitos establecidos en la legislación española en la LEY 14/2007, de 3 de Julio, de investigación biomédica, en la protección de datos de carácter personal y la bioética. No supone ni experimentación clínica con seres humanos, ni el sometimiento a los mismos a agente alguno. Se garantiza el estricto cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos Personales.

Preguntas/Información

Si usted tiene alguna pregunta con respecto al estudio puede dirigirse al médico del trabajo o con cualquiera miembro del equipo que realiza el estudio. El investigador responsable es la Profesora María José Prieto Castelló del Departamento de Patología y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández, cuyo teléfono de contacto es el 965919518 y la dirección de correo electrónico es mjose.prieto@umh.es, con quién podrá comunicar en cualquier momento.

**ANEXO II: FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR
ESCRITO. VOLUNTARIO EXPUESTO**

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

**TÍTULO DEL ESTUDIO: DETERMINACION DE MARCADORES
GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN
LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO**

Yo,
(nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con

(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En,.....a..... de..... de.....

Firma del participante

Firma del Investigador

Fecha:

Fecha:

ANEXO III. CUESTIONARIO DISOLVENTES. TRABAJADORES
EXPUESTOS

Nº de encuesta :

Fecha encuesta / /

Nombre:.....

DNI:

Edad: Fecha nacimiento / /

Sexo: Hombre: Mujer

Empresa

Actividad.....

Puesto trabajo:

DATOS ANTROPOMÉTRICOS/SOCIODEMOGRÁFICOS

PESO:

ALTURA:.....

LUGAR DE RESIDENCIA (población):.....

VIVIENDA RURAL (casa de campo fuera del centro de la ciudad)

VIVIENDA TIPO URBANO en ciudad (piso o casa)

POR FAVOR CONTESTE A LAS SIGUIENTES PREGUNTAS. TODA LA INFORMACIÓN TIENE CARÁCTER CONFIDENCIAL

1.1/. ¿Cuánto tiempo lleva Vd. trabajando en su empresa actual?

Nº de años: [][]

Nº de meses: [][]

1.2/. ¿Cuánto tiempo lleva Vd. Trabajando con colas / tintes / disolventes?

Nº de años: [][]

Nº de meses: [][]

HORARIO DE TRABAJO / EXPOSICIÓN

2.1/ Por término medio, ¿cuántas horas trabaja a la semana?

Nº de horas: [][]

2.2/ ¿cuántas horas al día está en contacto con colas/ /tintes / disolventes?

Nº de horas: [][]

Consumo de Tabaco

3/ Fumador: 3.1/ **SI** 3.1.1 Número cigarros/día __ 3.1.2. Años de fumador __

3.2 / **NO** 3.2.1/.Ex –fumador: **NO** **SI**

en caso afirmativo (exfumador):

3.2.2 ¿cuanto tiempo hace que dejó de fumar?

3.2.3 Cuando fumaba: Número cigarros/día __ 3.2.4 Años de fumador __

4./ Consumo de Alcohol

4.1/ No consume alcohol

4.2/ Consume alcohol ocasionalmente (una o dos veces semana,) 4.2.1 **NO** 4.2.2 **SI**

4.3/ Consume alcohol habitualmente (tres o más) 4/4 Consume alcohol en fin de semana



	número por día
4,3,1 vasos de vino	
4,3,2 vasos de cerveza	
4,3,3 otros. Copas	

	número por día
4,4,1 vasos de vino	
4,4,2 vasos de cerveza	
4,4,3 otros. Copas	

Moderado: _ > 40g/día o 280 g/semana (hombre)
_ > 24g/día o 168 g/semana (mujer)

Alto : _ < 40g/día o 280 g/semana (hombre)
_ < 24g/día o 168 g/semana (mujer)

CONDICIONES DE TRABAJO

5 - ¿SABE QUÉ PRODUCTOS QUÍMICOS MANIPULA? SI 2 NO

INDIQUE LOS NOMBRES DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS QUE MANIPULA:

UTILIZA ALGUNA MEDIDA DE PROTECCION DURANTE EL MANEJO O UTILIZACION DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS:

5.1 SI 5.2 NO

CODIGO	MEDIDA DE PROTECCION	SI	NO
5.1.1	Limitación de tiempo de exposición (trabaja con colas/tintes/disolventes solo una parte de la jornada)	1	2
5.1.2.	Tipo de ventilación en el puesto de trabajo	Extracción de aire localizada (campana, extractor...)	2
		Ventilación general forzada (extractores en las ventanas o paredes)	2
		Ventilación general natural (ventanas y puertas abiertas)	2
5.1.3	Protección personal vías respiratorias (mascarilla, máscara con filtro...)	1	2
5.1.4	Protección personal extremidades superiores (guantes impermeables..)	1	2
5.1.5	Tipo de recipiente que contiene la cola/tinte/disolvente	Abierto, (boca ancha)	2
		Cerrado, (recipiente de seguridad, bebedero de paloma)	2
5.1.6	Tipo de manipulación de colas/ tintes/disolventes	Manual (brocha)	2
		Automático (máquina)	2

6- HABITOS DE HIGIENE PERSONAL EN LA EMPRESA

CODIGO	HABITOS DE HIGIENE PERSONAL	SI	NO
6.1	¿Se ducha diariamente en la Empresa?	1	2
6.2	<u>En caso negativo</u> , ¿Se ducha diariamente en casa, al termino de la jornada laboral?	1	2
6.3	¿Se cambia de ropa al comenzar el trabajo?	1	2
6.4	<u>En caso afirmativo</u> , ¿la ropa de trabajo le cubre todo el cuerpo? (buzo o chaqueta y pantalón)	1	2
6.5	La ropa de trabajo y de calle ¿Se guardan en sitios separados?	1	2
6.6	¿Ingiere alimentos en el puesto de trabajo?	1	2
6.7	En caso afirmativo, ¿Se lava las manos antes de ingerirlos?	1	2
6.8	¿Hay una norma en la empresa que indique la necesidad de lavarse las manos antes de las comidas?	1	2
6.9	¿se dispone de un local preparado especialmente para tomar el bocadillo o comer?	1	2

7-ANTECEDENTES MÉDICOS PERSONALES

¿ HA TENIDO OTIENE ALGUNA DE LAS SIGUIENTES ENFERMEDADES ¿

7.1	Anemias, falta de hierro en sangre o de glóbulos rojos	SI	NO
7.2	Hemorragias frecuentes (por la nariz, heridas con sangrado difícil de parar...)	SI	NO
7.3	Enfermedades del hígado	SI	NO
7.4	Diabetes (azúcar en sangre)	SI	NO
7.5	Enfermedades del sistema nerviosos: <ul style="list-style-type: none"> • Polio (parálisis infantil) • Meningitis • Epilepsia 	SI	NO
7.6	¿ Ha estado a tratamiento siquiátrico?	SI	NO
7.7	Otras enfermedades	SI	NO
7.8	¿Ha sufrido alguna intoxicación por productos químicos?	SI	NO

Si lo considera necesario puede anotar las aclaraciones que desee en el siguiente apartado

OBSERVACIONES.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....



8/ Medicamentos habituales

Nombre medicamento	Dosis diaria

OBSERVACIONES.....

CUESTIONARIO DE SÍNTOMAS.

A continuación se le formulan una serie de preguntas sobre algunos trastornos que todos tenemos de vez en cuando. Este cuestionario trata de trastornos que quizá le resultarán familiares. Le pedimos que indique si ha tenido estos trastornos durante los últimos meses. Para ello marque con una **X** la casilla correspondiente.

Le invitamos a que responda a todas las preguntas.

Para cada pregunta, tiene usted 4 respuestas posibles y solo debe elegir una

Por ejemplo, para las primeras, las respuestas posibles son:

Nunca o muy pocas veces	Algunas veces	A menudo	Muy a menudo
-------------------------	---------------	----------	--------------

Si ha tenido ese trastorno bastante a menudo, marque la casilla "A menudo" y así sucesivamente.

Si le cuesta elegir una respuesta, fíese de la primera respuesta que le venga a la mente

9/ DURANTE ESTOS ÚLTIMOS MESES, ¿CON QUÉ FRECUENCIA?...

(Marque una sola casilla por pregunta)

	Nunca o muy pocas veces	Algunas veces	A menudo	Muy a menudo
9.1/ ¿Le ha faltado fuerza en los brazos y en las piernas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.2/ ¿Ha notado una pérdida de sensibilidad en las manos y los pies?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.3/ ¿Ha tenido vértigos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.4/ ¿Ha tenido náuseas (mareos)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.5/ ¿Ha tenido la sensación de tener los nervios de punta?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

9.6/ ¿Se ha sentido contrariado/a por cosas sin importancia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.7/ ¿Ha tenido cambios bruscos de humor?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.8/ ¿Ha notado falta de ánimo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.9/ ¿Ha tenido dificultad para contener su cólera?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.10/ ¿Ha tenido tendencia a olvidar cosas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.11 /¿Ha tenido la necesidad de anotar las cosas para recordarlas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.12/ ¿Ha oído decir que estaba perdiendo la memoria?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.13/ ¿Se ha sentido excesiva o anormalmente cansado/a por la noche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.14/ ¿Ha sentido falta de energía?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.15/ ¿Ha tenido problemas para dormirse?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.16/ ¿Se ha despertado sin razón durante el sueño?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.17/ ¿Ha tenido la garganta irritada (con ganas de toser todo el rato)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.18/ ¿Ha tenido un mal sabor de boca?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿PUEDE INDICAR HASTA QUÉ PUNTO ESTÁ DE ACUERDO O NO CON LAS FRASES SIGUIENTES? PARA ELLO UTILICE LAS 4 POSIBILIDADES DE RESPUESTA.

(Marque una sola casilla por pregunta)

	Totalmente en desacuerdo	En desacuerdo	De acuerdo	Totalmente de acuerdo
9.19/ en general soy sensible a las luces brillantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.20/ en general soy sensible al ruido del tráfico, la música y otros ruidos fuertes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.21/ me preocupo mucho por cosas sin importancia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.22/ con frecuencia tengo la sensación de que, en cualquier momento, puede ocurrirme una desgracia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.23/ en general, me falta confianza en mí.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ANEXO IV: HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO NO EXPUESTO

Título del estudio: DETERMINACION DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO

Le invitamos a participar en un estudio de investigación DETERMINACION DE MARCADORES GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO dentro del GRUPO CONTROL DEL ESTUDIO en calidad de *TRABAJADOR NO EXPUESTO A DISOLVENTES*. El estudio es realizado por el grupo de investigación “Medicina Legal y Laboral” de la Universidad Miguel Hernández y patrocinado por el Instituto de Salud Carlos III. Esta hoja de información describe en qué consiste el estudio, por lo que le rogamos la lea detenidamente antes de confirmar su participación. Por favor plantee al médico o al personal del estudio cualquier pregunta o cuestión que no entienda de esta hoja de información.

Objetivos del estudio

Es un estudio en el que se trata de obtener en voluntarios trabajadores del calzado sanos con riesgo químico por exposición a disolventes orgánicos en su trabajo (n-hexano, tolueno, acetona, MEK, etc) diferentes indicadores del nivel de exposición a los mismos. El objetivo es estudiar algunas enzimas responsables de la transformación de tóxicos orgánicos en el organismo (en particular, sus genotipos y fenotipos) y relacionar los datos obtenidos con los indicadores biológicos de los disolventes habitualmente utilizados en los programas de vigilancia de la Salud Laboral. Estos datos serán luego analizados mediante ordenador para poder obtener resultados y conclusiones. Para ello estudiaremos a personas sanas expuestas a disolventes y a personas sanas no expuestas en cuyo grupo está incluido usted.

Procedimiento del estudio

El estudio se realizará sobre trabajadores en activo, seleccionados de empresas del calzado, y dentro de éstas a los trabajadores que manipulan disolventes orgánicos en el proceso de producción. Estos trabajadores están, por tanto expuestos a disolventes en mayor o menor medida en función de sus condiciones de trabajo particulares. A los trabajadores no se les somete a exposición adicional a ningún agente nocivo, la exposición que se mide es la que ellos presentan como consecuencia de su actividad laboral habitual. También se estudiarán una muestra del mismo número de

trabajadores del mismo rango de edad y sexo y sin historia de exposición laboral a tóxicos, que se utilizará como grupo control.

El protocolo previsto para la ejecución del estudio consistirá en la evaluación higiénica del puesto de trabajo, la recogida de datos laborales y médicos que permitan detectar parámetros de inclusión/exclusión en el estudio, y la toma de muestras biológicas para la determinación de las variables objeto de estudio. La recogida de estas muestras se llevará a cabo dentro del protocolo de los exámenes de salud que se realizan anualmente por el médico del trabajo del Servicio de Prevención correspondiente, previa información al trabajador y mediante la firma del correspondiente consentimiento informado. El tipo de muestras que se les recogerá son orina, sangre y mucosa bucal, mediante procedimientos inocuos y por el mismo personal que realiza la extracción en el examen de salud. Las muestras serán analizadas en el laboratorio de Toxicología Laboral y Forense del Departamento de Patología y Cirugía de la Universidad Miguel Hernández. Las variables analíticas que se obtendrán son: a partir de las muestras de mucosa bucal, los estados genotípicos de los principales genes polimórficos de las principales enzimas que intervienen en la metabolización de los disolventes más utilizados en el calzado (CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1); a partir de las muestras de sangre, la expresión génica de dichas enzimas mediante la cuantificación del mRNA específico y la determinación del posible efecto citogenético mediante el test de micronúcleos; y a partir de las muestras de orina los niveles de los indicadores biológicos de los disolventes orgánicos (n-hexano, toluenos, MEK, acetona, etc) a los que están expuestos los trabajadores (2,5-hexanodiona, ácido hipúrico, MEK, acetona, etc en orina, respectivamente). Los datos personales que se manejarán serán los sociodemográficos y algunos de los incluidos en la historia clínica laboral a la que accede el médico del trabajo y que se utilizarán para detectar parámetros (hábitos tóxicos, IMC, patologías previas) que puedan influir en los resultados que se pretenden obtener y/o desaconsejen la inclusión del trabajador en el estudio.

Riesgos

La muestra de orina se recogerá en frasco estéril de poliestireno idéntico al utilizado para los análisis rutinarios de orina y que será facilitado al trabajador durante el reconocimiento médico. La extracción de la muestra de mucosa bucal se realizará por el profesional sanitario mediante frotis de mejilla utilización de una torunda de algodón estéril (Dacron, eurotubo collection swab). Ambas intervenciones no comportan ningún riesgo para el trabajador.

La muestra de sangre se recogerá a partir de la misma punción del antebrazo practicada por el profesional sanitario para la realización del análisis de sangre (hemograma y bioquímica) que se realiza rutinariamente en el reconocimiento médico por lo que no supone tampoco para usted ningún riesgo añadido al de la punción que se ha de realizar para recoger la muestra en el examen de salud. En cualquier caso, los riesgos que comportan la punción venosa podría ser levemente dolorosa o aparecer un hematoma.

Beneficios

No existe ningún beneficio particular para usted por el hecho de participar en el estudio. No obstante le serán facilitadas, a través de su médico del trabajo y con carácter absolutamente confidencial, los niveles que usted presenta de los indicadores biológicos utilizados en los programas de vigilancia de la Salud Laboral para evaluar la exposición a los disolventes orgánicos que manipula en su trabajo. También tendrá derecho a conocer con la misma confidencialidad los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

Además la información que se obtenga a partir de los resultados del estudio podría ser útil para proteger la salud y evitar la aparición de daños en la salud de trabajadores con riesgo químico por exposición a disolventes orgánicos, mediante la identificación de nuevos marcadores biológicos de estimación del riesgo, que puedan ser utilizados en los programas de Vigilancia de la Salud como estrategia preventiva.

Participación

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Si usted decidiera participar podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar ninguna explicación y sin perjuicio alguno. Si usted desea abandonar su participación en el estudio, por favor, notifíquesele a su médico del trabajo. No existen compensaciones o pagos por su participación. Se respeta lo establecido en el Real Decreto 223/2004 (art. 12.5) sobre menores de edad, inhábiles o legalmente incapaces.

Confidencialidad

El acceso a sus datos clínico-laborales se realizará guardando la más estricta confidencialidad de forma que no se viole la intimidad personal de los sujetos participantes en el mismo. Sus datos y muestras serán objeto de un tratamiento disociado, de modo que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o identificable.

Sus datos serán tratados de forma anónima en todo el desarrollo de la investigación y posteriormente a la misma. El equipo médico que le atiende recogerá la información acerca de usted y anotará sus datos de acuerdo a un código sin poner su nombre. Todos los datos que se recojan y se introduzcan en una base de datos se mantendrán confidenciales. El Investigador, cuando procese y trate sus datos tomará las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados. Los resultados que se obtengan de este estudio pueden aparecer en un informe final del mismo o en revistas científicas. Sin embargo su nombre no aparecerá en ningún informe o publicación. Usted puede revocar en cualquier momento el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales.

El estudio cumple con los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (59ª Asamblea Médica Mundial), en el Convenio del Consejo Europeo relativo a los derechos humanos y la biomedicina, así como con los requisitos establecidos en la legislación española en la LEY 14/2007, de 3 de Julio, de investigación biomédica, en la protección de datos de carácter personal y la bioética. No supone ni experimentación clínica con seres humanos, ni el sometimiento a los mismos a agente alguno. Se garantiza el estricto cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos Personales.

Preguntas/Información

Si usted tiene alguna pregunta con respecto al estudio puede dirigirse al médico del trabajo o con cualquiera miembro del equipo que realiza el estudio. El investigador responsable es la Profesora María José Prieto Castelló del Departamento de Patología y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández, cuyo teléfono de contacto es el 965919518 y la dirección de correo electrónico es mjose.prieto@umh.es, con quién podrá comunicar en cualquier momento.

**ANEXO V: FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR
ESCRITO. TRABAJADORES NO EXPUESTOS**

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

**TÍTULO DEL ESTUDIO: DETERMINACION DE MARCADORES
GENÉTICOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN
LABORAL A DISOLVENTES EN EL SECTOR DEL CALZADO**

RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE, ORINA Y MUCOSA BUCAL

Yo,
(nombre y apellidos)

- He recibido suficiente información sobre el estudio
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He hablado con el investigador sanitario

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio, como persona no expuesta

En,.....a..... de..... de.....

Firma del participante

Fecha:

ANEXO VI: CUESTIONARIO
TRABAJADORES NO EXPUESTOS

Nº de encuesta :

Fecha encuesta / /

Nombre:.....

DNI:

Edad: Fecha nacimiento / /

Sexo: Hombre: Mujer

Empresa

Actividad.....

Puesto trabajo:

DATOS ANTROPOMÉTRICOS/SOCIODEMOGRÁFICOS

PESO:

ALTURA:.....

LUGAR DE RESIDENCIA (población):.....

VIVIENDA RURAL (casa de campo fuera del centro de la ciudad)

VIVIENDA TIPO URBANO en ciudad (piso o casa)

POR FAVOR CONTESTE A LAS SIGUIENTES PREGUNTAS. TODA LA INFORMACIÓN TIENE CARÁCTER CONFIDENCIAL

HORARIO DE TRABAJO

1.1/ ¿Cuánto tiempo lleva Vd. trabajando en su empresa actual?

Nº de años: [][]

Nº de meses: [][]

1.2/ Por término medio, ¿cuántas horas trabaja a la semana?

Nº de horas: [][]

EXPOSICIÓN

2.1 / ¿Está usted actualmente trabajando con colas/ tintes / disolventes?

NO **SI**

EN CASO AFIRMATIVO

2.2/ ¿cuántas horas al día/semana está en contacto con colas/ /tintes / disolventes?

Nº de horas: [][]

2.3/ INDIQUE LOS NOMBRES DE LOS PRODUCTOS QUE MANIPULA:

CONSUMO DE TABACO Y ALCOHOL

Consumo de Tabaco

3/ Fumador: 3.1/ **SI** 3.1.1 Número cigarros/día __ 3.1.2. Años de fumador __

3.2 / **NO** 3.2.1/.Ex -fumador: **NO** **SI**

en caso afirmativo (exfumador):

3.2.4 ¿cuanto tiempo hace que dejó de fumar?

3.2.5 Cuando fumaba: Número cigarros/día __ 3.2.4 Años de fumador __

4./ Consumo de Alcohol

4.1/ No consume alcohol

4.2/ Consume alcohol ocasionalmente (una o dos veces semana,) 4.2.1 **NO** 4.2.2 **SI**

4.3/ Consume alcohol habitualmente (tres o más) 4/4 Consume alcohol en fin de semana

↓

	número por día
4,3,1 vasos de vino	
4,3,2 vasos de cerveza	
4,3,3 otros. Copas	

↓

	número por día
4,4,1 vasos de vino	
4,4,2 vasos de cerveza	
4,4,3 otros. Copas	

Moderado: _ > 40g/día o 280 g/semana (hombre)
_ > 24g/día o 168 g/semana (mujer)

Alto : _ < 40g/día o 280 g/semana (hombre)
_ < 24g/día o 168 g/semana (mujer)

5-ANTECEDENTES MÉDICOS PERSONALES

¿ HA TENIDO OTIENE ALGUNA DE LAS SIGUIENTES ENFERMEDADES ¿

5.1	Anemias, falta de hierro en sangre o de glóbulos rojos	SI	NO
5.2	Hemorragias frecuentes (por la nariz, heridas con sangrado difícil de parar...)	SI	NO
5.3	Enfermedades del hígado	SI	NO
5.4	Diabetes (azúcar en sangre)	SI	NO
5.5	Enfermedades del sistema nerviosos: <ul style="list-style-type: none"> • Polio (parálisis infantil) • Meningitis • Epilepsia 	SI	NO
5.6	¿ Ha estado a tratamiento siquiátrico?	SI	NO
5.7	Otras enfermedades	SI	NO
5.8	¿Ha sufrido alguna intoxicación por productos químicos?	SI	NO

Si lo considera necesario puede anotar las aclaraciones que desee en el siguiente apartado

OBSERVACIONES.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

6/ Medicamentos habituales

Nombre medicamento	Dosis diaria

OBSERVACIONES.....

CUESTIONARIO DE SÍNTOMAS.

A continuación se le formulan una serie de preguntas sobre algunos trastornos que todos tenemos de vez en cuando. Este cuestionario trata de trastornos que quizá le resultarán familiares. Le pedimos que indique si ha tenido estos trastornos durante los últimos meses. Para ello marque con una **X** la casilla correspondiente.

Le invitamos a que responda a todas las preguntas.

Para cada pregunta, tiene usted 4 respuestas posibles y solo debe elegir una

Por ejemplo, para las primeras, las respuestas posibles son:

Nunca o muy pocas veces	Algunas veces	A menudo	Muy a menudo
-------------------------	---------------	----------	--------------

Si ha tenido ese trastorno bastante a menudo, marque la casilla "A menudo" y así sucesivamente.

Si le cuesta elegir una respuesta, fíese de la primera respuesta que le venga a la mente

7/ DURANTE ESTOS ÚLTIMOS MESES, ¿CON QUÉ FRECUENCIA?...

(Marque una sola casilla por pregunta)

	Nunca o muy pocas veces	Algunas veces	A menudo	Muy a menudo
7.1/ ¿Le ha faltado fuerza en los brazos y en las piernas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.2/ ¿Ha notado una pérdida de sensibilidad en las manos y los pies?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.3/ ¿Ha tenido vértigos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.4/ ¿Ha tenido náuseas (mareos)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.5/ ¿Ha tenido la sensación de tener los nervios de punta?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.6/ ¿Se ha sentido contrariado/a por cosas sin importancia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7.7/ ¿Ha tenido cambios bruscos de humor?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.8/ ¿Ha notado falta de ánimo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.9/ ¿Ha tenido dificultad para contener su cólera?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.10/ ¿Ha tenido tendencia a olvidar cosas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.11 /¿Ha tenido la necesidad de anotar las cosas para recordarlas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.12/ ¿Ha oído decir que estaba perdiendo la memoria?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.13/ ¿Se ha sentido excesiva o anormalmente cansado/a por la noche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.14/ ¿Ha sentido falta de energía?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.15/ ¿Ha tenido problemas para dormirse?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.16/ ¿Se ha despertado sin razón durante el sueño?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.17/ ¿Ha tenido la garganta irritada (con ganas de toser todo el rato)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.18/ ¿Ha tenido un mal sabor de boca?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿PUEDE INDICAR HASTA QUÉ PUNTO ESTÁ DE ACUERDO O NO CON LAS FRASES SIGUIENTES? PARA ELLO UTILICE LAS 4 POSIBILIDADES DE RESPUESTA.

(Marque una sola casilla por pregunta)

	Totalmente en desacuerdo	En desacuerdo	De acuerdo	Totalmente de acuerdo
7.19/ en general soy sensible a las luces brillantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.20/ en general soy sensible al ruido del tráfico, la música y otros ruidos fuertes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.21/ me preocupo mucho por cosas sin importancia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.22/ con frecuencia tengo la sensación de que, en cualquier momento, puede ocurrirme una desgracia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.23/ en general, me falta confianza en mí.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

