

EVALUACIÓN DE RIESGO GENOTÓXICO POR EXPOSICIÓN LABORAL AL BETÚN EN LUSTRACALZADOS. LA PAZ-BOLIVIA

EVALUATION OF GENOTOXIC RISK DUE TO SHOE POLISH EXPOSURE IN SHOESHINE BOYS. LA PAZ-BOLIVIA

Mamani Josue¹, Tirado Noemí², Barrón Jessika³, Paz Rolando⁴, Cuti Marina⁴

¹ Médico Cirujano, Auxiliar de Investigación, Unidad de Toxicología, Instituto de Genética

² Jefe de Unidad de Genética Toxicológica, Instituto de Genética

³ Docente Investigadora, Instituto de Genética

⁴ Asistente de Investigación, Instituto de Genética

Título Abreviado: Biomonitorización de Lustracalzados con Exposición Laboral al Betún
Unidad de Genética Toxicológica- Instituto de Genética, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Medicina,
Miraflores, Av. Saavedra N°2246 Piso 9 (+591 2- 229613), La Paz - Bolivia

Autor para correspondencia: Josue Mamani Jarro

Email: josuemamani47@gmail.com

RECIBIDO: 14/12/2015

ACEPTADO: 07/10/2016

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el riesgo genotóxico en los lustracalzados expuestos laboralmente al betún y sus componentes.

Material y métodos: Estudio de casos-controles y autocontroles. Se estudiaron 53 lustracalzados y 24 controles. Se determinó el daño genotóxico mediante la técnica de micronúcleos y otras alteraciones metanucleadas en mucosa bucal.

Resultados: Las edades promedio del grupo de expuestos y controles fue de 35.0 ± 8.8 y 27.8 ± 1.5 respectivamente. El grupo de expuestos estuvo conformado varones (83%) y mujeres (17%), con un promedio de años de trabajo de 13.4 ± 7.6 , de los cuales la mayoría no usa medidas de protección laboral (73.6%). No se observó diferencias significativas en la frecuencia de alteraciones metanucleadas entre el grupo de expuesto y controles: binucleadas (BN) ($p=0.273$), broken egg (BE) ($p=0.635$), carriorexix (CR) ($p=0.677$), cariolisis (CL) ($p=0.770$), índice de reparación celular ($p=0.201$). El análisis de asociación entre exposición y genotoxicidad demostró que el uso del betún no es un factor de riesgo. La evaluación pre y post exposición al betún del grupo de lustracalzados no obtuvo diferencias significativas luego del periodo ventana para BN ($p=0.804$), BE ($p=1.274$), CR ($p=0.503$), CL ($p=1.000$) e IR ($p=0.424$).

Conclusión: El uso del betún en la población estudiada, no es un factor de riesgo genotóxico. Sin embargo, es necesario continuar estudios de cohorte con una población más numerosa.

Palabras claves: Lustracalzados, micronúcleos, índice de reparación celular, citotoxicidad.

ABSTRACT

Objective: To assess the genotoxic risk in shoeshine boys who are constantly exposed to shoe polish and its components.

Material and methods: The study was cross-sectional (exposed and controls) and of cross over trials. It was studied 53 shoe shiners (exposed group) and 24 controls. The buccal cytome technique was applied on children for determining genotoxic damage.

Results: The average age of the exposed group and controls was 35.0 ± 8.8 and 27.8 ± 1.5 respectively. The exposed group consisted males (83%) and women (17%), with an average of 13.4 years of work ± 7.6 , most of which do not use labor protection measures (73.6%). No significant differences were observed in frequency of metanucleadas alterations from the group of exposed and controls: binucleate (BN) ($p = 0.273$), broken egg (BE) ($p = 0.635$), karyorrhexis (KR) ($p = 0.677$), karyolysis (KL) ($p = 0.770$), cellular repair rate (RR) ($p = 0.201$). The analysis of association between exposure and genotoxicity showed that the use of shoe polish and its components is not a risk factor. The assessment pre and post-exposure to shoe polish in the exposed group showed no significant differences after the window period for BN ($p = 0.804$), BE ($p = 1.274$), CR ($p = 0.503$), CL ($p = 1.000$) and RR ($p = 0.424$).

Conclusion: The use of shoe polish by shoeshine boy population is not a genotoxic risk factor. However it is necessary to continue cohort studies with a larger population.

Keywords: Shoeshine boy, micronucleus, rate of cell repair, cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

La biomonitorización de poblaciones expuestas a riesgo laboral por uso de productos sospechosos de causar daño a través de marcadores de genotoxicidad es de vital importancia para la prevención de enfermedades como el cáncer¹⁻². La detección de micronúcleos en mucosa bucal es un biomarcador de efecto y se emplea en la evaluación de riesgo genotóxico por exposiciones ambientales y laborales a mutágenos³. Este ensayo permite la determinación de la actividad genotóxica de diferentes sustancias mediante la detección de roturas cromosómicas, pérdida cromosómica y apoptosis⁴.

La toxicidad por productos domésticos ha sido reportada en varios artículos, especialmente la relación existente entre metahemoglobinemia y el uso de productos con nitrobenzeno⁵. La dermatitis ocupacional de contacto irritativa también ha sido descrita para algunos de los disolventes presentes en la crema de zapato, como el tricloroetano⁶ y el nitrobenzeno que han sido reportados como sustancias genotóxicas y carcinógenas, dependiendo del tiempo y grado de exposición⁷. Morales A. (1993), reportó el caso de una paciente que posterior a exposición prolongada de 12 años al betún para calzados en una fábrica de zapatos, presentó cáncer de células transicionales de vejiga⁸.

El betún o crema para calzados es un producto cosmético utilizado para la limpieza de zapatos, o

limpieza de muebles. Está compuesto por parafina, naftenos, azufre, cera de carnauba, disolventes como 1-1-1 tricloroetano, 1-1-2 tricloroetano, 1-2 diclorobenzeno, 1-3 diclorobenzeno, cloroetano, 1-2 dimetilnaftaleno⁹, también es general el uso de anilina (nitrobenzeno)¹⁰. Se ha demostrado que estos hidrocarburos aromáticos inducen genotoxicidad en relación a dosis-respuesta¹¹.

Los lustracalzados son personas que realizan su trabajo con la utilización del betún o crema para calzados. La población de lustracalzados de la ciudad de La Paz está conformada en asociaciones de personas adultas, niños y adolescentes¹².

Debido a que la población de lustracalzados es un grupo expuesto de manera crónica a al betún-anilina y la inexistencia de investigaciones en relación a la seguridad laboral se plantea la necesidad de evaluar el riesgo de daño genotóxico y/o citotóxico en esta población.

El objetivo del presente estudio fue determinar la asociación entre la exposición prolongada a betún y daño genotóxico mediante la prueba de micronúcleos en mucosa bucal en lustracalzados de la ciudad de La Paz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos-controles y ensayo cruzado. El estudio de autocontrol o ensayo cruzado fue utilizado para medir la diferencia entre periodos que puede atravesar un sujeto expuesto (Periodo control previa exposición, y periodo post exposición)¹³.

La muestra se determinó en base al registro de lustracalzados de la Organización “Vamos Juntos” y el Sistema de Sección de Procesamiento Automático de Datos de la ciudad de La Paz¹⁴, considerando un universo de 3600 personas con un nivel de confianza de 95% y poder del 80%. Se estudió 77 personas de ambos sexos, entre las edades de 14-60 años. Se definió a 53 lustracalzados como “casos” y 24 familiares como “controles”.

Criterios de inclusión para caso-autocontrol: Personas de ambos sexos y una edad comprendida entre 14 a 60 años con exposición laboral al betún mayor o igual a un año.

Criterios de inclusión para controles: Familiares de lustracalzados, de ambos sexos y una edad comprendida entre 14 a 60 años, sin exposición laboral al betún.

Criterios de exclusión para ambos grupos: Personas con enfermedades crónico-degenerativas, oncológicas, consumo de drogas, y que rehúsan firmar el consentimiento informado.

Criterios de eliminación para ambos grupos: Personas que no cuenten con cuestionario debidamente llenado y/o cuya muestra de exfoliado de mucosa bucal resulten insuficientes o inadecuadas para su evaluación.

Definición de caso y autocontrol. Todos los sujetos con exposición laboral al betún para calzados mayor o igual a un año.

Definición de control. Grupo integrado por familiares de primer grado respecto a los lustracalzados que realizan otras actividades como amas de casa y estudiantes entre otros.

Determinación de exposición laboral a betún: Se aplicó un cuestionario dirigido para determinar las características laborales de los lustracalzados.

Determinación de daño genotóxico mediante técnica de micronúcleos en mucosa bucal

La obtención de todas las muestras de mucosa oral se realizó en dos fases (figura 1): 1) Inicio de la semana laboral, para los expuestos y controles; 2) Segunda toma de muestra, solo para los expuestos, se estableció una ventana de exposición de 14 días, tiempo en que las células epiteliales de la mucosa bucal sufren renovación

($x=14 \pm 7$ días)¹⁵.

Figura N° 1
Diseño de estudio de autocontrol y toma de muestra de mucosa bucal.



Fuente: Elaboración propia

Las muestras epiteliales de descamación de la mucosa bucal (células exfoliadas) se obtuvieron friccionando vigorosamente el interior de las mejillas de cada individuo, con un hisopo estéril, sin tocar los dientes ni la lengua, previo enjuague de la boca con agua¹⁶. Las muestras de células epiteliales de mucosa bucal fueron resuspendidas en tampón (EDTA 0.1M, TRIS-HCl 0.01M, NaCl 0.02M, a pH 7) y centrifugadas a 800 rpm durante 10 minutos. Luego el sobrenadante fue aspirado y desechado. Seguidamente, se le añadió 3 mL de tampón y fue resuspendido, (este paso se repitió tres veces hasta obtener una densidad adecuada de células). En una lámina de vidrio, se dejó gotear 50 μ L de la muestra dejándola secar al aire libre por un día aproximadamente y fijadas con metanol al 80% v/v. La tinción se realizó con Giemsa 6%, diluido en tampón Sørensen por 6 minutos. Finalmente, las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio óptico marca Olympus Cx 31, con un aumento de 40X. La evaluación se realizó en 1.500 células por individuo, mediante doble ciego para así determinar el número de micronúcleos (Mn) y las células con otros cambios nucleares como las células binucleadas (BN), el huevo roto o “broken egg” (BE), la cariorrexis (CR) y la cariolisis (CL)¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹ (Cuadro N° 1).

Cuadro 1. Criterios de Clasificación de Células de Mucosa Bucal, Según el Ensayo de Micronúcleos de Mucosa Bucal Basado en la Morfología Celular

Clasificación	Definición
Célula normal diferenciada	Tienen un núcleo teñido uniformemente y se distinguen de las células basales por su mayor tamaño y por un pequeño núcleo a citoplasma.
Célula con micronúcleo	Un micronúcleo debe ser inferior a un tercio del diámetro del núcleo principal; en el mismo plano de enfoque; tener los mismos colores, texturas, y la refracción como el núcleo principal; tienen una forma lisa, ovalada o redonda, y ser separados claramente desde el núcleo principal.
Células broken egg	Núcleo con una constricción aparente, afilado en un extremo del núcleo. El núcleo y las yemas nucleares se encuentran generalmente muy cerca y parecen estar unidos entre sí. Brotes tienen intensidad de tinción similar a la del núcleo principal.
Células binucleadas	Contienen dos núcleos principales en lugar de uno. Los núcleos son generalmente estrechos y de tamaño similar y la intensidad de la tinción.
Células con cariorrexis	Tienen un núcleo que contiene cromatina agregada extensa. Estas células pueden ser sometidas a una etapa tardía de la apoptosis. Fragmentación nuclear puede ser evidente.
Células con cariólisis	Ausencia de núcleo celular evidente como una imagen fantasmal.

Fuente: Modificado de Thomas P y col. *Buccal micronucleus cytome assay. Nature Protocols. 2009; 4 (6): 827-835*

ÉTICA

La participación de todos los sujetos estudiados fue voluntaria, con la firma del consentimiento informado para autorizar la realización del cuestionario y toma de muestra de mucosa bucal.

Esta investigación contó con la aprobación del Instituto de Genética de la Universidad Mayor de San Andrés y del Comité Nacional de Bioética.

DATOS ESTADÍSTICOS

Se realizó un análisis demográfico tomando en cuenta diversos criterios como los años de trabajo, edad, sexo, hábito de fumar y otros. El índice de reparación celular (RI) se calculó con la siguiente fórmula: $IR = CR + CL / BE + MN^{19}$.

El análisis del daño genotóxico y/o citotóxico se realizó mediante las pruebas de comparación de medias, U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes caso-control y la prueba de McNemar para el análisis de autocontroles; los niveles de significancia se consideraron por debajo de 0.05. Para el estudio de medidas de fuerza de asociación se utilizó el chi cuadrado de Pearson

con valor de significancia estadística de 0.05 y el Odds Ratio con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS versión 18.0.

RESULTADOS

Se estudió a 53 lustracalzados expuestos como grupo de caso y 24 familiares como controles. La media de edad para el grupo expuesto fue de 35.04 ± 8.8 años (r: 8-53 años) y en el grupo control fue de 27.8 ± 12.5 años (r: 14-56 años). En el grupo expuesto se encontró que existen más varones (83%) que mujeres (17%) que se dedican a esta labor.

La comparación de las características demográficas del grupo expuesto y de los controles para sexo, residencia, otra ocupación, hábitos sociales, enfermedades, edicamentosidas, pinturas o radiacista actividad laboral, siendo frecuentes actividades como labores de casa, estudio uesto (couso de medicamentos y exposición a otros genotóxicos, no mostró diferencias significativas respecto a la frecuencia de presentación de las variables (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características Demográficas del Grupo Expuesto y de los Controles					
Variable		Controles (n= 24)		Expuestos (n= 53)	
		N	%	N	%
Sexo	Hombre	4	16.7	44	83.0
	Mujer	20	83.3	9	17.0
Residencia	El Alto	20	83.3	40	75.5
	La Paz	4	16.7	13	24.5
Otra ocupación	Labores de casa	8	33.3	1	1.9
	Estudiante	8	33.3	5	9.5
	Cocinero	2	8.3	4	7.5
	Otros*	6	25.0	14	26.5
Tabaquismo	Si	5	20.8	17	32.1
	No	19	79.2	36	67.9
Consumo de alcohol	Si	11	45.8	35	66.0
	No	13	54.2	18	34
Enfermedad cardiovascular **	Si	6	25.0	14	26.4
	No	18	75.0	39	73.6
Fármacos ***	Si	4	16.7	9	17.0
	No	20	83.3	44	83.0
Exposición a RX (últimos 6 meses)	Si	1	4.2	8	15.1
	No	23	95.8	45	84.9
Uso de Plaguicidas-pesticidas	Si	0	0	5	9.4
	No	24	100	48	90.6
Exposición a Pinturas	Si	3	12.5	9	17.0
	No	21	87.5	44	83.0
Anilina	Si	0	0	53	100
	No	24	100	0	0

Fuente: Elaboración propia. 2013

* Las otras ocupaciones laborales incluyen: electricista, albañil, costurero, restauración de patrimonio, chofer, comerciante, limpieza.

** Otras enfermedades presentes en los lustracalzados son: gastrointestinal, epilepsia, artropatía, hematológica.

*** La medicación utilizada incluye: AINE, enalapril, carbamazepina, antibióticos.

La media de años de trabajo fue de 13.43 ± 7.67 . Respecto de las horas laborales por día, se obtuvo una media de 8.04 ± 2.5 . El 73.6% de los lustracalzados no utilizan el equipo de protección completo (Cuadro N° 3).

En el análisis de frecuencia de alteraciones metanucleadas, en los dos grupos de estudio, no se observó diferencias significativas en las medias de presentación para BN ($p = 0.273$), BE ($p = 0.635$), CR ($p = 0.677$), CL ($p = 0.770$) o IR ($p = 0.201$). El análisis divariado para el cálculo de asociación entre exposición y genotoxicidad demostró que el uso del betún no es un factor de riesgo: BN [OR 1.974 IC 95%: 0.578-6.733], BE OR [OR 0.127 IC 95%: 0.055-0.070], CR [OR 1.249 IC 95%: 0.438-3.3561], CL [OR 1.273 IC 95%: 0.408-3.970], e IR [OR 0.457 IC 95%: 0.135-

Cuadro 3. Medidas de Protección Laborales de los Lustracalzados			
Variable		N	%
Utilización de equipo de protección completo*	Si	14	26.4
	No	53	73.6
Guantes	Si	18	34.0
	No	35	66.0
Pasamontañas	Si	33	62.3
	No	20	37.7
Eliminación del betún con agua y jabón		33	62.3
Eliminación del betún con agua y detergente		10	18.9
Días laborales	L-V	41	77.4
	L-D	8	15.1
	L-M-V	3	N
	M-J	1	1.9

Fuente: Elaboración propia.2013

***Equipo completo:** guantes de latex o lana + pasamontaña

1.545]. No se determinó la diferencia de medias ni el OR para micronúcleos debido a que no se encontraron MN en el grupo de expuestos en la fase de pre exposición (Cuadro N° 4).

	Controles (N=24)	Expuestos (N=53) Pre exposición			
Variable	Media ± DE %	Media ± DE	Valor p*	OR	IC 95%
BN	1.33 ± 1.88	1.51 ± 2.25	0,273	1.974	0.578-6.733
BE	0.29 ± 0.62	0.40 ± 0.98	0,635	0.127	0.055-0.070
CR	6.17 ± 7.28	5.53 ± 4.40	0,677	1.249	0.438-3.561
CL	26.17 ± 17.89	26.28 ± 17.71	0,770	1.273	0.408-3.970
MN	0.13 ± 0.61	0	-----**	-----**	-----**
IR	3.24 ± 8.92	2.59 ± 7.32	0.201	0.457	0.135-1.545

Fuente: Elaboración propia.2013

* p<0.05 U de Mann Withney

**Valor no calculado por inexistencia de Mn en la toma inicial

El consumo de tabaco o alcohol no fueron factores influyentes para la frecuencia de BN, CR, CL (Cuadro N° 5). Sin embargo el OR para el IR en el grupo que consume alcohol fue 4.345 (IC 95%: 0.493-38.292) y en el grupo que consume tabaco fue 3.929 (IC95%: 0.824-18.73), es decir el consumo de alcohol y tabaco aumento 3.92 veces y 4.34 veces el IR respectivamente.

	Tabaco			Alcohol		
	P*	OR	IC 95%	P*	OR	IC 95%
CR	0.317	1.688	0.602-4.727	0.305	1.685	0.618-4.594
CL	0.259	2.163	0.555-8.429	0.636	0.764	0.249-2.339
BN	0.802	0.861	0.268-2.760	0.374	1.641	0.547-4.922
IR	0.072	3.929	0.824-18.731	0.156	4.345	0.493-38.292

Fuente: Elaboración propia.2013

* p<0.05 Chi cuadrado de Pearson

Se evaluó la pre y post exposición al betún en el grupo de lustracalzados mediante la prueba de McNemar para CR, CL y BN, pero no se obtuvo diferencias significativas luego del periodo ventana (Cuadro N° 6).

	Expuestos (n=53) Pre exposición	Expuestos (n=40) Post exposición	
Variable	Media ± DE	Media ± DE	Valor p*
BN	1.51 ± 2.25	1.78 ± 1.87	0.804
BE	0.40 ± 0.98	0.80 ± 2.11	1.274
CR	5.53 ± 4.40	9.80 ± 11.89	0.503
CL	26.28 ± 17.71	34.60 ± 20.11	1.000
MN	0	0.08 ± 0.47	-----
IR	2.59 ± 7.32	10.39 ± 24.10	0.424

Fuente: Elaboración propia.2013

** p<0.05 Prueba de McNemar

DISCUSIÓN

La biomonitorización de personas expuestas potencialmente a factores de riesgo genotóxico o citotóxico es una tarea de la genética toxicológica²⁰. Al respecto, la Academia Nacional de Ciencias de USA identificó cuatro estadios para la caracterización de riesgo ambiental: Identificación del riesgo, Evaluación de dosis respuesta, Evaluación de la exposición y Caracterización del riesgo²¹.

En un estudio realizado por Hodge and Downs¹⁷, se evaluó la toxicidad de productos caseros en las ratas, a las cuales les administró los productos en dosis de 0.5-50g/kg, se definió el rango letal como la más alta dosis tolerada y la mínima dosis para causar la muerte, se estimó la dosis letal del betún para calzados en una dosis mayor a 50g/kg. Este estudio concluyó que la crema de zapatos es un material prácticamente no tóxico, por el rango alcanzado (no tóxico: ≥ 15 g/kg) en comparación para otros grupos: ligeramente tóxico: 5-15g/kg o moderadamente tóxico: 0.5-5g/kg²². Sin embargo, estudios de genotoxicidad en trabajadores de la industria del calzado han reportado daño celular. Burgaz S et al encontraron un aumento de frecuencia de Mn, relacionado con la exposición a compuestos usados en la fabricación de zapatos²³.

Los resultados del presente estudio muestran que el betún no sería un factor de riesgo genotóxico, debido a que no existió diferencia significativa de la frecuencia de alteraciones metanucleadas entre el grupo de expuestos y el grupo control, además la presencia de micronúcleos estuvo dentro de los parámetros normales durante el periodo pre y post ventana²⁴. No obstante, el aumento del índice de reparación celular en el grupo de lustracalzados se debió al mayor incremento de CL y CR en comparación con el aumento de BE y Mn luego de la ventana de exposición. La producción de

CR y BE relacionan con la degeneración celular ya que la CR y BE preceden a la formación de CL y Mn que ocurre antes del daño citogenético y citotóxico²⁵. Por otra parte, el aumento del índice de reparación celular representa una respuesta adaptativa a la injuria celular, fenómeno es propio de la mucosa bucal, producto del efecto masticatorio, pero que es mayor con el consumo de tabaco y alcohol²⁶.

CONCLUSIONES

El uso del betún en la población de lustracalzados estudiada, no es un factor de riesgo genotóxico. Sin embargo, es necesario continuar estudios de cohorte con una población más numerosa.

LIMITACIONES

Durante la segunda fase de toma de muestras, se perdió contacto con 13 personas del grupo de expuestos, debido a inasistencia de la población para la toma de muestras.

La no detección de micronúcleos durante la primera etapa de la toma de muestras en el grupo de expuestos limitó el análisis estadístico.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaramos no presentar ningún conflicto de interés para la realización, y/o publicación del presente artículo.

AGRADECIMIENTOS

A los lustracalzados y sus familiares que participaron en el estudio.

A la asociación de apoyo social y educativo "Vamos Juntos", que trabaja con los lustracalzados en temas de educación y salud. A la Unidad de Genética Toxicológica del Instituto de Genética, por el apoyo académico y financiero para la realización del presente trabajo de investigación.

A Tania Daniela Patón Mamani, por su colaboración en la redacción y estilo.

REFERENCIAS

1. WHO/PCS. *Environmental Health Criteria ISS. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva. 1993
2. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F et al. *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on chemical safety. Mutat Res. 2000; 468 (2): 111 – 172*
3. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi M, Zeiger E, Knasmueller S, et al. *The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutat Res. 2008; (659): 93–108*
4. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. *Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. Mutat Res Rev.2010; (705): 11–19.*
5. Herranz M, Clerigué N. *Intoxicación en niños. Metahemoglobinemia. ANALES Sis San Navarra 2003; 26 (1): 209-223.*
6. Romero A. *Dermatitis reaccionales. Rev Fac Med UNAM. 2003; 46 (4): 148-151*
7. *Departamento de Salud y servicios para personas mayores de New Jersey. Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. 2004: 1-6*
8. Morales A. *Shoe polish Dyestuff carcinogenicity. JAMA. 1993; 25 (5): 528*
9. Hathaway W S. *Sources of toxic compounds in household wastewater. United States Environment Protection Agency. EPA 1980; 600/2-80-128:*
10. Angelosanto FA, Blackburn G R, Schreiner C A, Mackerer C R. *Benzene Induces a Dose-responsive Increase in the Frequency of Micronucleated Cells in Rat Zymbal Glands; Environ Health. 1996; 104(6):1331-1336*
11. Zeise L, Wilson R, Croucht E A C. *Dose -Response Relationships for Carcinogens: A Review. Environmental Health Perspectives. 1987; (73): 259-308*
12. *Asociación de apoyo social y educativo Vamos Juntos. Diagnóstico Comunitario e Institucional. 2010.*
13. Martin J, Albavera C, Salazar E. *Estudio epidemiológico de casos y autocontroles: una aproximación conceptual y metodológica. Gac Med Mex. 2010; 146 (1): 37-43*
14. Anónimo. *La Alcaldía delimitará el sitio de trabajo de los lustrabotas. La Prensa. 2011. Feb 10; Sec Sociales.*
15. Thomas P et al. *Buccal micronucleus cytome assay. Nature Protocols. 2009; 4 (6): 827-835*
16. Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT. *Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. Mutat Res.1996; (371): 237–248*
17. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. *The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. Mutagenesis. 1987; (2): 11-17.*
18. Fenech M et al. *Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells—a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. Mutagenesis. 2007; 22 (1): 3–4*
19. Ramirez A, Saldanha P. *Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinoma. Genetics and Molecular Research. 2002; 1 (3): 246-260*
20. Paz y Miño C, Creus A, Leone P. *Genética toxicológica y carcinogenesis. Ed. Quito / SENACYT-FUNDACYT / 2001: 17-18.*
21. Stewart V, Waters M. *Genetic toxicology and risk assessment of complex environmental mixture. Drug and Chemical Toxicology. 1996; 19 (3): 187-129*
22. Hodge H, Downs W. *The approximate oral toxicity in rats of selected household products. Toxicology and Applied pharmacology. 1961; (3): 689-695*
23. Burgaz S, Erdem O, CAKMAK G, Erdem N, Karakaya A, Karakaya AE. *Cytogenetic analysis of buccal cells from shoeworkers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methylethyl ketone and formaldehyd. N Biomarkers 2002; (7): 151-161*
24. Bonassi S, et al. *The Human Micronucleus project on Exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res. 2011; 80 (10): 1-10*
25. Bhattathiri VN. *Amitotic cell division and tumour growth: an alternative model for cell kinetic compartments in solid tumours. Oral Oncol. 2001; (37): 288-295*
26. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. *Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smear: a field test in snuff user. Am J Epidemiol. 1991; (134): 840-850*