



TESE DE DOUTORAMENTO

**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN PROFESIONAL A  
QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS EN  
PERSONAL SANITARIO**

José Ángel Lema Atán

**ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE  
SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN AVANCES E NOVAS  
ESTRATEGIAS EN CIENCIAS FORENSES**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



D./Dna. **Manuel María López-Rivadulla Lamas**

En condición de: **Titor/a e director/a**

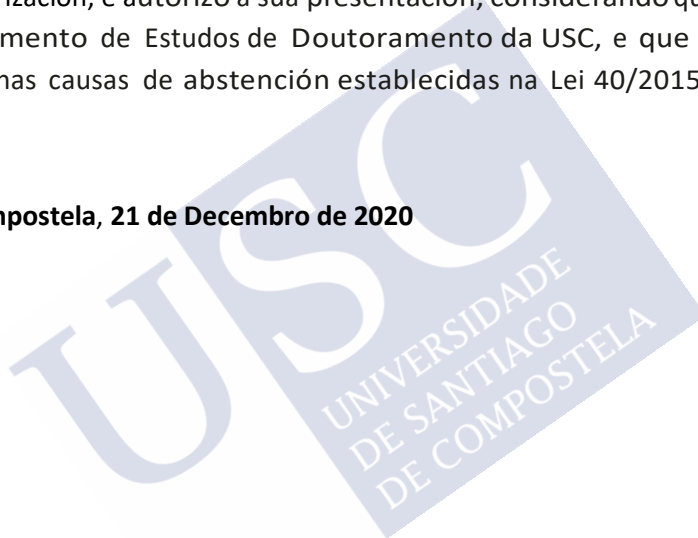
Título da tese: **Evaluación de la exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en personal sanitario**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna José Ángel Lema Atán, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 21 de Decembro de 2020**

**Asdo.:**





D./Dna. **Ana de Castro Ríos**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **Evaluación de la exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en personal sanitario**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna José Ángel Lema Atán, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 21 de Decembro de 2020**

**Asdo.:**







## DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

### Evaluación de la exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en persoal sanitario

D./Dna. José Ángel Lema Atán

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En **Santiago de Compostela, 24 de Decembro de 2020**

**Asdo.:**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al profesor Manuel López-Rivadulla, director y tutor de esta Tesis, por ofrecerme la oportunidad de ser parte del grupo, su optimismo y su experiencia para la realización de este trabajo.

A la profesora Ana de Castro, directora de esta Tesis, por enseñarme, tranquilizarme en momentos de agobio y soportarme todos estos años.

A la profesora Angelines Cruz, coordinadora del Programa de Doctorado, por estar siempre dispuesta a ayudar.

A la Doctora Elena Lendoiro, por toda su ayuda y consejos para la realización de esta Tesis.

Thanks to professor Susan Duthie for giving me the opportunity to learn with her during my stage abroad.

A los técnicos de laboratorio, Salva y Pablo, por todas las risas, y alguna que otra bronca, durante estos años.

A mis compañeras, y también amigas de andaduras, Ángela, Lucía y María, por hacer del laboratorio un lugar ameno y familiar, por las risas, los “lloros” y las charlas para resolver el mundo.

A Irene, nuestra querida técnica de Waters, nuestra salvadora, por siempre hacer hueco para ayudar cuando surge algún problema con los equipos. Sin ti esta Tesis tampoco sería posible.

A mis amigos de la carrera, Iván, Juanjo, Carla y Mónica, por todos los buenos momentos pasados juntos y por los que vendrán, y con los que, a pesar del distanciamiento especialmente en estos tiempos de pandemia, siempre puedo contar con ellos.

A mis padres, por ayudarme a llegar hasta aquí y apoyarme durante todo el camino, y a mi hermano, por escucharme siempre y por los ánimos dados.



## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Cáncer: definición, incidencia, prevalencia y mortalidad .....	3
1.1.1.	Datos en España .....	4
1.2.	Formación del cáncer .....	5
1.3.	Factores de riesgo .....	8
1.4.	Tratamiento del cáncer .....	11
1.4.1.	Fármacos citostáticos .....	11
1.5.	Exposición ocupacional a fármacos citostáticos en el ambiente hospitalario .....	19
1.5.1.	Vías de exposición .....	20
1.5.2.	Efectos adversos en trabajadores expuestos.....	20
1.5.3.	Guías y recomendaciones para el manejo de fármacos peligrosos .....	23
1.5.4.	Medidas preventivas para el manejo de fármacos antineoplásicos.....	26
1.5.5.	Monitorización de la exposición .....	28
II.	METODOLOGÍAS ANALÍTICAS. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS.....	83
2.1.	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	85
2.2.	Ensayo cometa o “Single cell gel electrophoresis” (SCGE).....	89
2.3.	Viabilidad celular .....	94
III.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	97
IV.	PARTE EXPERIMENTAL (1). DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS CITOSTÁTICOS EN SUPERFICIES Y PARCHES DÉRMICOS MEDIANTE HPLC-MS/MS.....	103
4.1.	Material y métodos .....	105

4.1.1.	Instrumentación y material de laboratorio .....	105
4.1.2.	Disolventes y reactivos, sustancias patrón y disoluciones .	107
4.1.3.	Metodología analítica.....	109
4.1.4.	Validación del método en superficies .....	113
4.1.5.	Validación del método en brazaletes .....	121
4.1.6.	Aplicación a muestras reales .....	121
4.2.	Resultados y Discusión .....	126
4.2.1.	Procedimiento de muestreo y extracción .....	126
4.2.2.	Condiciones cromatográficas .....	132
4.2.3.	Condiciones de espectrometría de masas.....	135
4.2.4.	Validación del método en superficies .....	137
4.2.5.	Validación del método en brazaletes .....	146
4.2.6.	Aplicación a casos reales .....	150
V.	PARTE EXPERIMENTAL (2). DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS CITOSTÁTICOS EN ORINA DE TRABAJADORES EXPUESTOS MEDIANTE UPLC- MS/MS.....	175
5.1.	Material y métodos .....	177
5.1.1.	Instrumentación y material de laboratorio .....	177
5.1.2.	Disoluciones.....	179
5.1.3.	Metodología analítica.....	180
5.1.4.	Validación del método en orina .....	183
5.1.5.	Aplicación a muestras reales .....	187
5.2.	Resultados y Discusión .....	188
5.2.1.	Procedimiento de extracción.....	188
5.2.2.	Condiciones cromatográficas .....	192
5.2.3.	Condiciones de espectrometría de masas.....	195
5.2.4.	Validación del método en orina .....	198

5.2.5.	Aplicación a casos reales .....	209
VI.	EXPERIMENTAL PART (3). “ <i>IN VITRO</i> ” EVALUATION OF EXPOSURE TO CYTOSTATIC DRUGS IN DNA DAMAGE AND REPAIR IN THE U-937 CELL LINE.....	219
6.1.	Materials and methods .....	221
6.1.1.	Instrumentation .....	221
6.1.2.	Materials .....	221
6.1.3.	Solvents, chemicals, certified reference materials .....	222
6.1.4.	Solutions.....	223
6.1.5.	Experimental design.....	224
6.1.6.	Statistical analysis.....	230
6.2.	Results and discussion.....	231
6.2.1.	Cell viability .....	231
6.2.2.	DNA damage.....	235
6.2.3.	DNA damage repair.....	240
	BIBLIOGRAFÍA.....	249
VII.	CONCLUSIONS .....	315
	ANEXOS .....	319

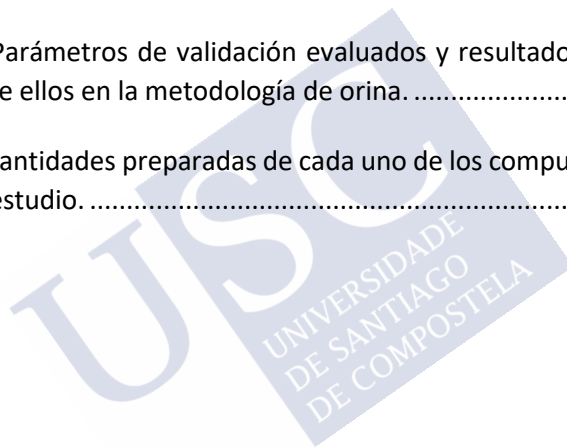


## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Estudios en los que se evalúa la exposición biológica a fármacos citostáticos en la orina de trabajadores.....	32
<b>Tabla 2:</b> Estudios en los que se evalúa la exposición a fármacos citostáticos en superficies de trabajo, guantes, viales y parches dérmicos.....	44
<b>Tabla 3:</b> Estudios en los que se evalúa el daño en el ADN de los trabajadores expuestos a fármacos citostáticos mediante el ensayo cometa.....	74
<b>Tabla 4:</b> Método cromatográfico para la separación de 12 compuestos citostáticos en superficies y brazaletes.....	111
<b>Tabla 5:</b> Valores seleccionados de los parámetros del espectrómetro de masas.....	113
<b>Tabla 6:</b> Tolerancia máxima permitida en el ión ratio en función de la intensidad relativa de los iones.....	115
<b>Tabla 7:</b> Parámetros de validación evaluados, experimentos realizados y criterios de aceptación.....	119
<b>Tabla 8:</b> Distintas columnas analíticas evaluadas para la separación cromatográfica.....	133
<b>Tabla 9:</b> Método de MRM utilizado para la detección de 12 compuestos citostáticos en superficies y parches dérmicos.....	135
<b>Tabla 10:</b> Valores medios $\pm$ desviación estándar de los parámetros relativos al modelo de calibración para los compuestos que siguieron un modelo lineal ( $y=a+b*x$ ) o cuadrático ( $y=a+b*x^2+c*x$ ) en superficies y parches.....	139
<b>Tabla 11:</b> Límites de detección y cuantificación de los 12 compuestos citostáticos en superficies y parches dérmicos.....	140

<b>Tabla 12:</b> Resultados de exactitud total y precisión iinterdía, intradía y total para los 8 compuestos citostáticos validados cuantitativamente. ....	141
<b>Tabla 13:</b> Resultados de efecto matriz, rendimiento de extracción y eficiencia del proceso (%) para todos los compuestos.....	144
<b>Tabla 14:</b> Resultados de estabilidad para cada compuesto en superficies y parches dérmicos en comparación con muestras frescas (%). ....	145
<b>Tabla 15:</b> Parámetros de validación evaluados y resultados obtenidos para cada uno de ellos en la metodología de superficies. ....	146
<b>Tabla 16:</b> Muestras de superficies con resultado positivo, localización, período de muestreo, limpieza, resultado y fase de monitorización.....	153
<b>Tabla 17:</b> Resultados obtenidos en muestras de viales, blísteres, bolsas de infusión, contenedor de residuos de CSB y filtros HEPA (ng).....	159
<b>Tabla 18:</b> Valores encontrados en las superficies muestreadas (pg/cm <sup>2</sup> ). 160	
<b>Tabla 19:</b> Valores de contaminación encontrados en viales, blísteres y bolsas de infusión (ng) (n=29). ....	160
<b>Tabla 20:</b> Método cromatográfico para la separación de 11 compuestos citostáticos en orina. ....	182
<b>Tabla 21:</b> Valores seleccionados de los parámetros del espectrómetro de masas.....	183
<b>Tabla 22:</b> Parámetros de validación evaluados, experimentos realizados y criterios de aceptación en muestras de orina.....	185
<b>Tabla 23:</b> Método de MRM utilizado para la detección de 12 compuestos citostáticos en orina. ....	196
<b>Tabla 24:</b> Valores medios ± desviación estándar de los parámetros relativos al modelo de calibración para los compuestos citostáticos en orina. ....	199

<b>Tabla 25:</b> Límites de detección y cuantificación de los 12 compuestos citostáticos en orina. ....	200
<b>Tabla 26:</b> Resultados de exactitud total y precisión interdía, intradía y total para los 9 compuestos citostáticos validados cuantitativamente. ....	202
<b>Tabla 27:</b> Resultados de efecto matriz, rendimiento de extracción y eficiencia del proceso (%) para todos los compuestos en orina. ....	204
<b>Tabla 28:</b> Resultados de estabilidad para cada compuesto en orina en comparación con muestras frescas (%). ....	206
<b>Tabla 29:</b> Parámetros de validación evaluados y resultados obtenidos para cada uno de ellos en la metodología de orina. ....	207
<b>Tabla 30:</b> Cantidades preparadas de cada uno de los compuestos citostáticos objeto de estudio. ....	211





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema del procedimiento de muestreo realizado para la toma de muestras de superficies. ....	110
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo de la distribución del Servicio de Farmacia ubicado en el Área de Oncología. Los puntos marcados con una “X” indican los sitios de muestreo. ....	123
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo de la distribución del Servicio de Farmacia ubicado en el Área de Farmacia. Los puntos marcados con una “X” indican los sitios de muestreo. ....	124
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo de la distribución del Área de pacientes del Hospital de Día de Oncología. Los puntos marcados con una “X” indican los sitios de muestreo. ....	125
<b>Figura 5:</b> Fortificación de los segmentos de la placa de acero inoxidable añadiendo 2 x 125 µL de disolución con pipeta de 200 µL (A), o bien añadiendo 250 µL directamente a chorro (B.1) o mediante gotas (B.2). ..	129
<b>Figura 6:</b> Cromatograma de los compuestos citostáticos en muestras de superficies al LOD. ....	132
<b>Figura 7:</b> Cromatograma con las transiciones cuantificadoras para cada analito al LOD. ....	193
<b>Figure 8:</b> Arbitrary units assigned to the different comets in the SCGE assay according to the size and shape of the tail from 0 (undamaged) to 4 (maximum damage). ....	229
<b>Figure 9:</b> Assessment of cell viability after exposure to different concentrations of methanol for 4 h (9A) and 1 week (9B). Statistical significance: * p <0.05 versus control (T-Student test). ....	233
<b>Figure 10:</b> Assessment of cell viability after exposure to different concentrations of cyclophosphamide (10A), 5-fluoruracil (10B), etoposide	

(10C) and cisplatin (10D) for 4 hours. Statistical significance: \*  $p < 0.05$  versus control (Wilcoxon test). ..... 234

**Figure 11:** Assessment of cell viability after exposure to different concentrations of cyclophosphamide for 1 week. Statistical significance: \*  $p < 0.05$  versus control (Wilcoxon test). ..... 235

**Figure 12:** Induction of DNA damage after exposure to different concentrations of cyclophosphamide (12A), 5-fluoruracil (12B), etoposide (12C) and cisplatin (12D) for 4 h using the alkaline comet assay. Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test). ..... 237

**Figure 13:** Induction of DNA damage after exposure to a mixture of cyclophosphamide, 5-fluoruracil, etoposide and cisplatin at different concentrations for 4 h using the alkaline comet assay. Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test). ..... 238

**Figure 14:** Induction of DNA damage after exposure to different concentrations of cyclophosphamide for 48 h (14A) and 1 week (14B), and after exposure to increased concentrations of cyclophosphamide for 4 h (14C). Statistical significance:  $p > 0.05$  (T-Student test) (14A);  $p > 0.05$  (Wilcoxon test) (14B and 14C). ..... 239

**Figure 15:** DNA repair after exposure to cyclophosphamide at different concentrations for 4 h (15A) and 1 week (15B), combined with exposure to MMS for 30 minutes, using the alkaline comet assay. Cells were evaluated after treatment with cyclophosphamide (UT), after 30 minutes of additional incubation with MMS (T0), and after a 30 minutes drug-free incubation period (T30). Statistical significance:  $p > 0.05$  (T-Student test) (15A). Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test) (15B). ..... 241

**Figure 16:** DNA repair ratio after exposure to different concentrations of cyclophosphamide for 4 h (16A) and 1 week (16B), combined with exposure to MMS for 30 minutes, and after an additional 30 minutes drug-free incubation period. Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test). ..... 242

## ABREVIATURAS

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ACN: acetonitrilo

AIHA: American Industrial Hygiene Association

ALARA: As Low As Reasonably Achievable

AMACSA: American Medical Association's Council on Scientific Affairs

AMMTAS: Asociación Madrileña de Medicina del Trabajo en el Ámbito Sanitario

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilancia de la Salud

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization

ASHP: American Society of Health-System Pharmacists

ASSTSAS: Asociación conjunta para la seguridad y salud en el trabajo en el sector de asuntos sociales

BGV: Biological Guidance Value

BLV: Biological Limit Value

BSC: Biological Safety Cabinet

CA: Chromosomal Aberrations

CBMN: Cytokinesis-Block Micronucleus assay

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CEIm-G: Comité de Ética de Investigación con Medicamentos de Galicia

CID: Collision-Induced Dissociation

COFRAC: Comité Francés de Acreditación

CSB: Cabina de Seguridad Biológica

CSDTD: Closed-System Drug Transfer Device

CV: Coeficiente de Variación

DAD: Diode Array Detector

DCM: diclorometano

DG-EMPL: Dirección General de Empleo, Asuntos Sociales e Inclusión de la Comisión Europea

DMSO: dimetilsulfóxido

DOEL: Dermic Occupational Exposure Limit

EC: Energía de Colisión

ECD: Electron Capture Detector

ECHA: European Chemicals Agency

EDTA: ethylene-diaminotetraacetic acid

EI: Electronic Impact

EMA: European Medicines Agency

EPI: Equipo de Protección Individual

ESI: ElectroSpray Ionization

EU-OSHA: Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo

F/T: Freeze/Thaw

FBAL: alfa-fluoro-beta-alanina

FDA: Food and Drug Administration

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

FPIA: Fluorescence Polarization Immunoassay

GC: Gas Chromatography



HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HRMS: High Resolution Mass Spectrometry

I.V.: intravenoso

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICH: International Conference of Harmonization

ICP: Inductively Coupled Plasma

IDL: Instrumental Detection Limit

INMETRO: Instituto Nacional de Metrología, Normalización y Calidad Industrial

INSHT: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

INSST: instituto Nacional de Seguridad y Salud en el trabajo

IPA: isopropanol

ISOPP: International Society of Oncology Pharmacy Practitioners

IT: Ion Trap

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

IWGTP: international Workshop on Genotoxicity Test Procedures

LC: Liquid Chromatography

LLE: Liquid-Liquid Extraction

LLOQ: Lower Limit of Quantification

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

$m/z$ : relación masa/carga

MDL: Method Detection Limit

Min: minuto

MMS: metil-metanosulfonato

MN: micronúcleos

MRE: Mean Relative Error

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MS/MS: tandem mass spectrometry

MS: Mass Spectrometry

MSD: Mass-Selective Detection

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

MTT: [bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio]

NIH: National Institute of Health

NIOSH: National Institute of Occupational Safety and Health

NPD: Nitrogen-Phosphorus Detector

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OELV: Occupational Exposure Limit Value

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONS: Oncology Nursing Society

OSHA: Occupational Safety and Health Administration

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PEL: Permissible Exposure Limit

PES: Phenazin Ethosulfate

PFM: pentafluorofenil

PI: Patrón Interno

PPE: Personal Protective Equipment

PS-DVB: poliestireno-divinilbenceno

QC: Quality Control

REDECAN: Red Española de Registros del Cáncer

REL: Recommended Exposure Limit

RPM: Revoluciones por minuto

RSD: Relative Standard Deviation

S/N: relación señal/ruido

SCE: Sister Chromatid Exchange

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis

SCOEL: Scientific Committee on Occupational Exposure Limits

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SFSTP: Sociedad Francesa de Ciencia y Tecnología Farmacéutica

SIM: Single Ion Monitoring

SPE: Solid Phase Extraction

SWGTOX: Scientific Working Group for Forensic Toxicology

TLV: Threshold Limit Value

TOF: Time-of-Flight

UA: Unidades Arbitrarias

UHPLC (UPLC®): Ultra-High Performance Liquid Chromatography

ULOQ: Upper Limit of Quantification

UMA: Unidad de Masa Atómica

US: UniSpray

USC: Universidad de Santiago de Compostela

USP: United States Pharmacopeia

UV: ultravioleta

VC: Voltaje de Cono

WEEL: Workplace Environmental Exposure Limit



## RESUMEN

La alta incidencia de cáncer, junto con la mayor supervivencia de los pacientes, hace necesario el manejo de cantidades cada vez mayores de fármacos antineoplásicos, lo cual unido a la diversificación del uso de estos tratamientos en enfermedades no neoplásicas incrementa el riesgo de exposición de los trabajadores en contacto con estas sustancias. Farmacéuticos, técnicos de farmacia, enfermeros y auxiliares de enfermería son las categorías profesionales consideradas, tradicionalmente, de mayor riesgo debido a su implicación en tareas de dispensación, preparación y administración de los fármacos. Sin embargo, se ha observado que otros profesionales no implicados directamente en la manipulación de agentes antineoplásicos como cuidadores, celadores, ayudantes, nutricionistas, personal de limpieza y personal administrativo también pueden presentar un cierto riesgo de exposición, e incluso los trabajadores de otras instituciones como residencias de ancianos, cuidadores a domicilio y lavanderías industriales. Los efectos tóxicos de estos compuestos en los trabajadores fueron descritos ya a finales de los años 70, y desde entonces numerosos estudios han investigado la presencia de contaminación en los ambientes de trabajo y en la orina de los trabajadores para determinar el riesgo de exposición. Sin embargo, en España se ha llevado a cabo un único estudio para determinar la exposición ocupacional a agentes citostáticos en superficies de trabajo. Por tanto, es necesario evaluar los niveles de contaminación por agentes antineoplásicos en hospitales españoles. Para ello, se desarrollaron 2 metodologías analíticas basadas en el empleo de LC-MS/MS para la determinación de 12 compuestos citostáticos en: a) superficies de trabajo y brazaletes colocados en los antebrazos de los trabajadores (evaluación de contaminación ambiente), y b) orina de los trabajadores (evaluación de contaminación biológica). Las superficies analizadas incluyeron diversas zonas del Área de Farmacia (bandeja de trabajo de la CSB, suelos, mostradores, carros, bandejas, viales, bolsas de perfusión, blísteres de medicamentos, mesas, lápices, ratón y teclado del ordenador) y del Área de Pacientes del Hospital de Día de Onco-Hematología (bombas de perfusión, suelos, sillones de administración, baños de pacientes). Las muestras de superficies se recogieron, por lo general, tras finalizar el turno de trabajo, pero antes de la limpieza de las mismas, a excepción de las muestras de las CSB, que también se recogieron al inicio del turno. Por su parte, las muestras de orina se recogieron al inicio y tras

finalizar el turno de trabajo durante 3 días no consecutivos pertenecientes a la misma semana. Por otro lado, se evaluó también el efecto sobre el ADN de 4 compuestos citostáticos (ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, etopósido y cisplatino) mediante el ensayo cometa, utilizando como modelo una línea celular de monocitos humanos. Los resultados obtenidos mostraron contaminación por agentes citostáticos en diversas superficies del Área de Farmacia y del Área de Pacientes (CSB, suelos, cajetines, mesa de documentación, teclado del ordenador, bombas de infusión, sillones de administración, baños, viales, bolsas I.V. y blísteres), así como en los brazaletes del personal encargado de la preparación de las formulaciones intravenosas, lo que indica que existe riesgo de exposición. Por el contrario, no se detectó la presencia de ninguno de los compuestos evaluados en la orina de los trabajadores. Por último, no se observó daño significativo en el ADN tras la exposición de las células a diversas concentraciones de los 4 fármacos evaluados, a excepción de etopósido a las concentraciones más altas (1000 y 10000 pg/mL). Tampoco se observaron diferencias significativas en la capacidad de reparación tras la exposición de las células a ciclofosfamida durante 4 horas y 1 semana.



## RESUMO

A alta incidencia de cancro, xunto coa maior supervivencia dos pacientes, fai necesario o manexo de cantidades cada vez maiores de fármacos antineoplásicos, o cal unido á diversificación do uso destes tratamentos en enfermidades non neoplásicas incrementa o risco de exposición dos traballadores en contacto con estas substancias. Farmacéuticos, técnicos de farmacia, enfermeiros e auxiliares de enfermería son as categorías profesionais consideradas, tradicionalmente, de maior risco debido á súa implicación en tarefas de dispensación, preparación e administración dos fármacos. Con todo, observouse que outros profesionais non implicados directamente na manipulación de axentes antineoplásicos como coidadores, celadores, axudantes, nutricionistas, persoal de limpeza e persoal administrativo tamén poden presentar un certo risco de exposición, e mesmo os traballadores doutras institucións como residencias de anciáns, coidadores a domicilio e lavanderías industriais. Os efectos tóxicos destes compostos nos traballadores foron descritos xa a finais dos anos 70, e desde entón numerosos estudos investigaron a presenza de contaminación nos ambientes de traballo e nos ouriños dos traballadores para determinar o risco de exposición. Con todo, en España levouse a cabo un único estudo para determinar a exposición ocupacional a axentes citostáticos en superficies de traballo. Por tanto, cómpre avaliar os niveis de contaminación por axentes antineoplásicos en hospitais españois. Para iso, desenvóléronse 2 metodoloxías analíticas baseadas no emprego de LC-MS/MS para a determinación de 12 compostos citostáticos en: a) superficies de traballo e brazaletes colocados nos antebrazos dos traballadores (avaliación de contaminación ambiente), e b) nos ouriños dos traballadores (avaliación de contaminación biolóxica). As superficies analizadas incluíron diversas zonas da área de Farmacia (bandexa de traballo da CSB, chans, mostradores, carros, bandexas, viais, bolsas de perfusión, blísteres de medicamentos, mesas, lapis, rato e teclado do computador) e da Área de Pacientes do Hospital de Día de Onco-Hematoloxía (bombas de perfusión, chans, cadeiras de administración, baños de pacientes). As mostras de superficies recolléronse, polo xeral, tras finalizar a quenda de traballo, pero antes da limpeza das mesmas, excepto as mostras das CSB que tamén se recolleron ao comezo da quenda. Pola súa banda, as mostras de ouriños recolléronse ao comezo e tras finalizar a quenda de traballo durante 3 días non consecutivos pertencentes á mesma semana. Doutra banda, avalíouse tamén o efecto sobre o ADN de 4

compostos citostáticos (ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, etopósido e cisplatino) mediante o ensaio cometa, utilizando como modelo unha liña celular de monocitos humanos. Os resultados obtidos mostraron contaminación por axentes citostáticos en diversas superficies da área de Farmacia e da área de Pacientes (CSB, chans, caixas de dispensación, mesa de documentación, teclado do computador, bombas de infusión, cadeiras de administración, baños, viais, bolsas I.V. e blísteres), así como nos brazaletes do persoal encargado da preparación das formulacións intravenosas, o que indica que existe un risco de exposición. Pola contra, non se detectou a presenza de ningún dos compostos avaliados nos ouriños dos traballadores. Por último, non se observou dano significativo no ADN trala exposición das células a diversas concentracións dos 4 fármacos avaliados, excepto etopósido ás concentracións máis altas (1000 e 10000 pg/mL). Tampouco se observaron diferenzas significativas na capacidade de reparación trala exposición das células a ciclofosfamida durante 4 horas e 1 semana.



## RESUME

The high incidence of cancer, together with the greater survival of patients, makes it necessary to manage increasing amounts of antineoplastic drugs, which together with the diversification of the use of these treatments in non-neoplastic diseases increases the risk of exposure of the workers in contact with these substances. Pharmacists, pharmacy technicians, nurses and nursing assistants are the professional categories traditionally considered to be at higher risk due to their involvement in drug dispensing, preparation and administration tasks. However, it has been observed that other professionals not directly involved in the manipulation of antineoplastic agents such as caregivers, orderlies, assistants, nutritionists, cleaning personnel and administrative personnel may also present a certain risk of exposure, and even workers from other institutions such as nursing homes, home carers and industrial laundries. The toxic effects of these compounds on workers were described as early as the late 1970s, and since then numerous studies have investigated the presence of contamination in work environments and in workers' urine to determine the risk of exposure. However, in Spain a single study has been carried out to determine occupational exposure to cytostatic agents on work surfaces. Therefore, it is necessary to assess the levels of contamination by antineoplastic agents in Spanish hospitals. For this, 2 analytical methodologies based on the use of LC-MS/MS were developed for the determination of 12 cytostatic compounds in: a) work surfaces and bracelets placed on the workers' forearms (environmental contamination), and b) the urine of workers (biological contamination). The surfaces analysed include various areas of the Pharmacy Area (BSC work tray, floors, counters, trolleys, trays, vials, infusion bags, medicine blisters, tables, pencils, computer mouse and keyboard) and the Patients Area of the Onco-Hematology Day Hospital (infusion pumps, floors, administration chairs, patient bathrooms). Surface samples were generally collected after the end of the work shift, but prior to surface cleaning, except for the BSC samples, which were also collected at the beginning of the shift. Urine samples were collected at the beginning and after the end of the work shift for 3 non-consecutive days belonging to the same week. On the other hand, the effect on DNA of 4 cytostatic compounds (cyclophosphamide, 5-fluorouracil, etoposide and cisplatin) was also evaluated by the comet assay, using a human monocyte cell line as a model. The results obtained showed contamination by cytostatic agents on various

surfaces of the Pharmacy Area and the Patients Area (BSC, floors, boxes, documentation table, computer keyboard, infusion pumps, administration chairs, bathrooms, vials, I.V. bags and blisters), as well as on the bracelets of the personnel responsible for the preparation of intravenous formulations, which indicates that there is a risk of exposure. On the contrary, the presence of any of the evaluated compounds was not detected in the urine of the workers. Finally, no significant DNA damage was observed after exposing the cells to various concentrations of the 4 drugs evaluated, with the exception of etoposide at the highest concentrations (1000 and 10000 pg/mL). No significant differences were also observed in repair capacity after exposure of cells to cyclophosphamide for 4 hours and 1 week.





## I. INTRODUCCIÓN



### 1.1. Cáncer: definición, incidencia, prevalencia y mortalidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un término genérico que designa un conjunto amplio de enfermedades que pueden afectar a cualquier órgano o tejido del organismo, y que se caracteriza por la aparición de células anómalas de rápida multiplicación y con capacidad de invadir tejidos adyacentes. Estas células anómalas pueden propagarse a otras zonas del organismo, proceso conocido como metástasis, siendo ésta una importante causa de muerte. Otros términos como tumor maligno o neoplasia maligna también son utilizados para referirse al cáncer [1].

Según el informe GLOBOCAN, en el año 2018 se estimaron más de 18 millones de nuevos casos de cáncer, siendo el cáncer de pulmón y mama los más frecuentes, con una incidencia del 11,6% cada uno, seguidos por el colorrectal (10,2%), próstata (7,1%), no melanoma de piel (5,8%), estómago (5,7%), hígado (4,7%) y esófago (3,2%). La incidencia fue mayor en hombres que en mujeres, siendo el cáncer de pulmón (14,5%), próstata (13,5%), colorrectal (10,9%), estómago (7,2%), hígado (6,3%), vejiga (4,5%) y esófago (4,2%) los de mayor incidencia, mientras que en el caso de las mujeres el de mayor incidencia fue el cáncer de mama (24,2%), seguido por el cáncer de cervix/útero (11%), colorrectal (9,5%), pulmón (8,4%), tiroides (5,1%), estómago (4,1%) y ovario (3,4%) [2; 3]. Así, uno de cada 5 hombres y una de cada 6 mujeres desarrolló cáncer en algún momento de su vida [4].

La prevalencia de cáncer a 5 años fue de casi 44 millones de casos en 2018, siendo el cáncer de mama el más prevalente (15,7%), seguido del colorrectal (10,9%), próstata (8,5%), pulmón (4,9%), tiroides (4,6%), vejiga (3,8%) y estómago (3,6%). Sin embargo, al realizar una separación por sexo, el cáncer de próstata (17,7%), colorrectal (12,3%), pulmón (6,2%), vejiga (6,2%), estómago (4,9%), linfoma no Hodgkin (3,5%) y leucemia (3,2%) fueron los más prevalentes en hombres, mientras que en mujeres destacaron el cáncer de mama (30,1%), cervix/útero (12,1%), colorrectal (9,6%), tiroides (6,9%), pulmón (3,6%) y ovario (3,3%) [2; 3].

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, y una de las principales causas de morbi-mortalidad, representando cerca de 9,6 millones de muertes en 2018 [1; 2; 5]. Aproximadamente una de cada seis muertes fue debida al cáncer

[1], siendo el cáncer de pulmón (18,4%), colorrectal (9,2%), estómago (8,2%), hígado (8,2%), mama (6,6%), esófago (5,3%) y páncreas (4,5%) los principales causantes. En hombres, las mayores tasas de mortalidad fueron debidas al cáncer de pulmón (22%), hígado (10,2%), estómago (9,5%), colorrectal (9%), próstata (6,7%) y esófago (6,6%), mientras que en mujeres el cáncer de mama (15%), pulmón (13,8%), colorrectal (9,5%), cérvix (7,5%), estómago (6,5%) e hígado (5,6%) causaron las mayores tasas de muerte. A nivel global, uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres falleció debido a algún tipo de cáncer [4].

A pesar de que Europa representa el 9% de la población mundial, engloba el 23,4% de la carga mundial de cáncer y el 20,3% de las muertes debidas a esta enfermedad [2; 4]. Sin embargo, la tasa de mortalidad por cáncer se ha reducido, de media, un 18% desde 1990 [6].

El aumento de la carga de cáncer se debe principalmente al incremento de la población y al aumento de la esperanza de vida, lo que se traduce en un mayor número de casos, asociado además a cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo [2; 7]. Según el último informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), se ha producido un aumento considerable de la esperanza de vida en todos los países miembros [5]. De este modo, en el año 2000 se produjeron 10,1 millones de nuevos casos de cáncer [8], en 2008 se registraron 12,7 millones [9], en 2012 la cifra fue de 14,1 millones [10] y en 2018 fue de más de 18 millones [2], lo que supone un incremento del 223% con respecto a los datos del año 1990 [11]. Según las estimaciones realizadas, se prevé que para el año 2040 se produzca un aumento del 63,4% en el número de casos con respecto a 2018, situándose alrededor de los 29,5 millones de nuevos casos en todo el mundo [12]. Del mismo modo, se ha producido también un incremento en las cifras de mortalidad, situándose en 6,2 millones de muertes en el año 2000 [8], 7,6 millones en 2008 [9], 8,2 millones en 2012 [10] hasta alcanzar casi 9,6 millones en 2018 [2] lo que supone un aumento del 83% con respecto a la cifra del año 1990 [13].

### **1.1.1. Datos en España**

En España, el número de casos de cáncer diagnosticados sigue aumentando desde hace años debido al aumento poblacional, el envejecimiento de la población, la exposición a factores de riesgo y al

aumento de la detección precoz [14-18]. En 2018 se han diagnosticado 270.363 nuevos casos de cáncer, mostrando un incremento del 25,4% con respecto a la cifra del año 2012 [14]. Los tipos de cáncer más frecuentes fueron el cáncer colorrectal (13,7%), mama (12,1%), próstata (11,7%), pulmón (10,1%) y vejiga (6,8%) [3]. Según las estimaciones realizadas, uno de cada dos hombres y cerca de una de cada tres mujeres desarrollará cáncer a lo largo de su vida [15].

Por otro lado, a pesar de observarse un aumento en el número de muertes por cáncer desde 1993 (incremento del 37,8%) [19], la tasa de mortalidad ha descendido en las últimas décadas debido a los avances terapéuticos, las actividades preventivas y las campañas de diagnóstico precoz, lo que se traduce en una mayor tasa de supervivencia [15-18]. Esto se observó en el descenso de las tasas de mortalidad del 1,32% y 0,56% anual en hombres y mujeres, respectivamente, entre los años 2003-2012, a pesar de producirse un incremento en la incidencia [15; 16; 20]. La OCDE, en su informe del 2013, también señaló un descenso del 13% en la tasa de mortalidad en España entre el año 1990 y 2011 [21]. A pesar de ello, según los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), los tumores constituyeron la segunda causa de muerte en España (26,4% de los fallecidos), por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio (28,3% de las muertes) [18]. Así, en 2018 se han producido 113.584 muertes por cáncer, de las cuales el mayor porcentaje se atribuye al cáncer de pulmón (20,2%), colorrectal (14,5%), páncreas (6,4%), mama (5,7%), próstata (5,1%), vejiga (5%) y estómago (4,9%) [3]. Según los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) de 2015, una de cada 3 muertes en varones y una de cada 5 muertes en mujeres fueron debidas a tumores malignos [15].

En números absolutos, España figura como uno de los países europeos con mayor incidencia de tumores y con una mayor mortalidad. Sin embargo, debido a que contamos con una de las mayores esperanzas de vida, al comparar la incidencia y mortalidad ajustadas por edad, éstas se homogenizan [15; 16].

## **1.2. Formación del cáncer**

Las células cancerosas se forman debido a acumulaciones sucesivas de cambios genéticos que permiten a estas células sobrevivir, multiplicarse y evitar los mecanismos regulatorios de apoptosis, proliferación y ciclo celular.

Estas células pierden su estructura, función y mecanismos normales de regulación [22].

Estos cambios son el resultado de la interacción entre el material genético y 3 tipos de agentes carcinógenos externos:

- \* Agentes físicos como la radiación ionizante y ultravioleta.
- \* Agentes químicos como el asbesto, componentes del humo del tabaco, aflatoxinas, arsénico...
- \* Agentes biológicos causantes de infecciones como las producidas por ciertos virus (virus del papiloma humano, virus de la hepatitis B y C, virus Epstein-Barr), bacterias (*Helicobacter pylori*) y parásitos (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* y *Schistosoma haematobium*).

Sin embargo, otro factor importante a considerar en la formación de un cáncer es la edad, ya que con los años el material genético de las células va acumulando cambios irreparables debidos tanto a agentes carcinógenos externos como a errores en el proceso de replicación celular, lo que puede derivar en la formación de una lesión cancerosa o tumor [1; 16]. Según los informes de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), la probabilidad de desarrollar cáncer en España aumenta a partir de los 40 años, haciéndose más pronunciada a partir de los 55 años [15; 18].

La biología del cáncer es un proceso complejo que no depende de un solo factor, causa o mutación, sino que es necesario que se produzcan una serie de sucesos múltiples que ocurren de forma independiente [23]. En primer lugar, existen diferentes tipos de mutaciones que pueden dar lugar a un cáncer. Algunas tan simples como la sustitución, inserción o supresión de un nucleótido, mientras que otras pueden ser más complejas e involucrar a segmentos de cromosomas dando lugar a ganancia, amplificación o supresión de una o ambas copias de un gen, inversión de la orientación de la secuencia de ADN o incluso translocaciones entre cromosomas. En segundo lugar, dicha complejidad se debe a que se producen multitud de mutaciones en una gran cantidad de genes [22; 24; 25].

La formación de un tumor es un proceso basado en 2 fundamentos: la aparición continua de cambios en el material genético y la selección de aquellos cambios que confieran a la célula una ventaja de supervivencia y

crecimiento [22; 25]. Estos cambios en el material genético pueden ser hereditarios (producidos en células germinales y transferidos a la descendencia) o somáticos (en cualquier otra célula del organismo y no transmisible por herencia). Las mutaciones somáticas pueden ser debidas a agentes carcinógenos externos o como consecuencia de errores en los mecanismos de reparación endógenos, por lo que mutaciones en los genes reparadores del ADN también pueden dar lugar a la aparición de una lesión tumoral [22-24]. Existen 5 mecanismos implicados en la reparación del ADN: reparación de la escisión de bases, que corrige errores menores; reparación de la escisión de nucleótidos, que corrige lesiones que alteran la estructura de doble hélice del ADN; reparación de errores de replicación; reparación de roturas de la doble cadena de ADN; y reparación de bases metiladas o alquiladas [24].

Las mutaciones pueden producirse de manera continuada durante toda la vida o espontáneamente en un corto período de tiempo [25]. Aquellas mutaciones que han sido positivamente seleccionadas y le confieren a la célula una ventaja de crecimiento en su entorno se conocen como mutaciones promotoras. Las restantes mutaciones se conocen como mutaciones pasajeras y no dan lugar a ninguna ventaja de crecimiento, pero estuvieron presentes en el predecesor de la célula cancerosa cuando adquirió las mutaciones promotoras [22; 25]. Otro tipo de mutaciones promotoras son las que confieren a la célula resistencia frente al tratamiento [25].

Las mutaciones promotoras se producen en genes que regulan funciones importantes de la célula como el crecimiento, proliferación, metabolismo y muerte celular, tales como los oncogenes y los genes supresores de tumores. Ambos tipos de genes deben alterarse para desencadenar la formación de un tumor. Sin embargo, el proceso de mutación y selección no termina en este punto, sino que es un proceso dinámico que continúa una vez establecida la lesión neoplásica, modificando constantemente el comportamiento del tumor, dando lugar a fenotipos más agresivos y metastásicos [22].

Los oncogenes son genes implicados en la regulación de los procesos normales de crecimiento y proliferación celular, y su alteración puede provocar un crecimiento descontrolado. Por su parte, las mutaciones en los genes supresores de tumores impiden la muerte celular y, por tanto, la

proliferación de la célula cancerosa. Un ejemplo claro de este tipo de genes es el gen supresor de tumores conocido como TP53, el cual codifica una proteína, la p53, cuyo objetivo es el mantenimiento de la integridad celular ejerciendo su efecto mediante la represión de la señalización proliferativa de las células, mejorando los efectos de los supresores del crecimiento, sensibilizando las células a la apoptosis y autofagia, suprimiendo la inmortalidad replicativa a través de la senescencia, controlando la inflamación, ejerciendo efectos anti-angiogénicos y reprimiendo la metástasis, lo que contrarresta un gran conjunto de actividad promotoras de tumores [24]. Aproximadamente el 90% de las mutaciones somáticas son de carácter dominante, es decir, la mutación de uno de los alelos es suficiente para contribuir a la formación de la neoplasia, y éstas se producen principalmente en oncogenes. El 10% restante es de carácter recesivo, es decir, se requiere la mutación de los dos alelos, y tiene lugar mayormente en genes supresores de tumores [22; 23; 25].

Por último, otro aspecto importante a considerar en la formación de un tumor es la epigenética, que se conoce como la regulación de la expresión genética independientemente de la secuencia de ADN. Los genes contienen en su secuencia distintos sitios de unión a proteínas alrededor de las regiones codificantes, que actúan como potenciadores, aisladores o silenciadores. Estos sitios facilitan la unión de los factores de transcripción, dando lugar a la activación o bloqueo de la transcripción. Además, la actividad de estos factores de transcripción también puede ser modulada mediante la modificación post-translacional de las proteínas que lo integran. De este modo, estos procesos pueden estar también sujetos a procesos de mutación y selección. Por tanto, aquellos cambios epigenéticos que incrementen el crecimiento y supervivencia celular tendrán un efecto positivo en el proceso de formación de una neoplasia [22; 24; 25].

### **1.3. Factores de riesgo**

Según la OMS, alrededor de un tercio de las muertes por cáncer son debidas a 5 principales factores de riesgo dietéticos y conductuales tales como el índice de masa corporal, el bajo consumo de frutas y verduras, el sedentarismo y el consumo de alcohol y tabaco [1; 5] y, junto con la exposición a agentes ambientales, podrían explicar el 90-95% de los casos de cáncer, ya que solo un 5-10% de los casos de cáncer son hereditarios [6].

Los datos del Informe GLOBOCAN 2012 indican que, en países industrializados, un 36,6% de los casos de cáncer están relacionados con el estilo de vida, mientras que solo un 9,6% se relaciona con infecciones. Esta situación se invierte en el caso de países con medio/bajo índice de desarrollo, en los que los casos de cáncer relacionados con infecciones representan el 25%, por delante de los cánceres relacionados con el estilo de vida (20,3%) [24].

El tabaco es el factor de riesgo más importante, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en el mundo [24], responsable de, aproximadamente, el 33% de los tumores [18] y el 22% de las muertes por cáncer [1]. El humo de tabaco contiene más de 7.000 compuestos químicos, algunos de los cuales han sido clasificados como carcinógenos por la IARC (International Agency for Research on Cancer) [24]. Además, las evidencias científicas indican que la exposición involuntaria al humo del tabaco en fumadores pasivos puede provocar cáncer, con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón del 25% [24; 26].

El consumo de alcohol es también un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer. Los tumores frecuentemente asociados con el consumo excesivo de alcohol incluyen cáncer de la cavidad oral, faringe, laringe, esófago, hígado, colorrectal y mama. Las bebidas alcohólicas también han sido clasificadas como carcinógenas por la IARC (Grupo 1), siendo el etanol el carcinógeno más importante. En 2010, el alcohol fue responsable del 12% de los tumores a nivel mundial [18]. Ese mismo año se produjeron 337.400 muertes causadas por neoplasias malignas atribuibles al consumo de alcohol, representando un 0,6% de todas las muertes y un 4,2% de las muertes por cáncer, siendo el cáncer de hígado el mayor contribuidor con un 23,9%. Asimismo, los cánceres atribuidos al alcohol fueron responsables del 12,3% de todas las muertes atribuidas al consumo de alcohol [24].

El exceso de grasa corporal, relacionado con el sobrepeso y la obesidad, es también un factor de riesgo importante para el desarrollo de ciertos tipos de cáncer como esófago, colon, páncreas, mama, endometrio y riñón. Además, se correlaciona con un peor diagnóstico. La actividad física regular reduce el riesgo de cáncer contribuyendo al control del peso corporal [24].

Otro factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer son las infecciones. La IARC ha clasificado como carcinógenos en humanos 11 agentes biológicos causantes de infecciones producidas por virus (virus de Epstein-Barr, virus hepatitis B, virus hepatitis C, herpesvirus de sarcoma de Kaposi, VIH-1, papilomavirus humano y virus linfotrófico tipo 1 de células T), bacterias (*Helicobacter pilori*) y parásitos (*Opistorchis viverrini*, *Opistorchis sinensis* y *Schistosoma haematobium*) [27]. En 2018, el número de nuevos casos de cáncer atribuibles a patógenos fue del 13%, siendo *Helicobacter pilori* el mayor agente causal (36,3%), seguido de papilomavirus humano (31,1%), virus de hepatitis B (16,3%) y virus de hepatitis C (7,1%) [28; 29]. Además de las infecciones, cabe destacar también el papel de los procesos inflamatorios como un factor de riesgo. Así, enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pancreatitis o endometriosis pueden jugar un papel importante en la aparición de lesiones pre-cancerosas. Este estado inflamatorio también puede ser adquirido como resultado de la infección por agentes patógenos como los mencionados anteriormente, o debido a agentes químicos como el alcohol y el asbesto, o incluso a estados patológicos como la obesidad [24].

Asimismo, la exposición laboral a ciertos productos y circunstancias también puede ser un factor de riesgo importante, ya que algunos de ellos como el asbesto, metales pesados o hidrocarburos aromáticos policíclicos entre otros, han sido clasificados como carcinógenos por la IARC [24].

También entrañan cierto riesgo la exposición a radiaciones ionizantes y ultravioleta, especialmente en edades tempranas, los contaminantes ambientales, ciertos productos naturales producidos por bacterias, hongos o plantas, y productos farmacéuticos como fármacos antineoplásicos, inmunosupresores, hormonas y fenacetina.

En lo que se refiere a fármacos antineoplásicos, se ha evidenciado la aparición de neoplasias secundarias en pacientes curados [30-38] y la IARC ha clasificado 12 de estos compuestos como carcinógenos en humanos [24].

De este modo, se estima que entre el 30-50% de los casos de cáncer podrían prevenirse evitando, en la medida de lo posible, los factores de riesgo e implementando estrategias de prevención tales como vacunarse frente a ciertos virus, reducir la exposición a radiaciones ionizantes y ultravioleta, y minimizar los riesgos laborales. Por otro lado, la prevención

engloba también la detección precoz y el tratamiento [1]. De este modo, en 2017 se han producido cerca de 3 millones de muertes prematuras que podrían haberse evitado mediante una mejor prevención e intervención. De éstas, 1,85 millones fueron consideradas evitables y 1,05 millones fueron consideradas tratables. Así, el 32% de las muertes evitables corresponde al cáncer, mientras que la cifra es del 26% en el caso de muertes tratables [5].

#### **1.4. Tratamiento del cáncer**

El tratamiento del cáncer depende del tipo, localización y grado de evolución del mismo, e incluye cirugía, radioterapia y tratamiento sistémico como quimioterapia o inmunoterapia [1; 39; 40].

Aunque el término “quimioterapia” implica cualquier tratamiento basado en la utilización de sustancias químicas, también se emplea para referirse al uso de fármacos citostáticos y/o antineoplásicos [39; 41].

##### **1.4.1. Fármacos citostáticos**

Los fármacos citostáticos son sustancias citotóxicas capaces de inhibir o impedir el crecimiento y evolución de la neoplasia, por lo que se utilizan preferentemente, aunque no exclusivamente, en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Estos fármacos restringen la maduración y proliferación de las células malignas mediante la alteración del metabolismo y/o el bloqueo de la división celular al interrumpir alguna de las fases de su ciclo celular. Este mecanismo hace que, a su vez, sean sustancias con potenciales propiedades mutágenas, genotóxicas, carcinógenas, y/o teratógenas [42-44].

Debido a que actúan sobre alguna de las fases del ciclo celular, estos fármacos son muy activos sobre células que se encuentran en proceso de división, hecho que no afecta solamente a las células neoplásicas, sino también al resto de células sanas del organismo, especialmente aquellas que presenten una mayor tasa de división tales como las células de la médula ósea, folículos pilosos, tubo digestivo y sistema reproductor, por lo que son considerados agentes no selectivos [45].

### 1.4.1.1. Clasificación de los fármacos citostáticos

Los fármacos citostáticos pueden clasificarse en función de distintos criterios:

- Nivel de actuación dentro del ciclo celular [42]:
  - Fármacos específicos de fase: actúan sobre fases específicas del ciclo celular como la fase S de síntesis de ADN (como los fármacos antimetabolitos) o sobre la fase de mitosis (como los alcaloides de la vinca). Estos fármacos suelen ser más efectivos frente a tumores con una gran tasa de proliferación y crecimiento.
  - Fármacos sin especificidad de fase: no actúan en una fase concreta sino que pueden ejercer su acción en cualquier etapa del ciclo celular. Son efectivos frente a tumores de crecimiento lento. A su vez, se dividen en 2 grupos:
    - Específicos de ciclo: actúan sobre las células en división sin importar la fase del ciclo celular en que se encuentren (agentes alquilantes y dacarbazina).
    - No específicos de ciclo: actúan sobre las células en estado de reposo, aunque también tienen efecto sobre células durante el ciclo celular (antibióticos citostáticos, excepto bleomicina).
- Mecanismo de acción [39; 42; 46-49]:
  - Agentes alquilantes: forman enlaces entre las cadenas de ADN debido a la gran afinidad de sus radicales altamente reactivos, impidiendo así la replicación y transcripción del ADN. Ejercen su acción durante todo el ciclo celular pero son más activos sobre células en rápida división. Forman parte de este grupo compuestos como ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, carmustina, tiotepa, busulfán y dacarbazina, entre otros.
  - Antimetabolitos: son análogos estructurales de metabolitos fisiológicos que intervienen en los procesos normales de crecimiento y división celular. Estos compuestos pueden seguir los mismos pasos que el metabolito endógeno, llegando a incorporarse a las cadenas de ADN y ARN hasta alcanzar un punto en que se altera una función celular al producir un falso

mensaje [49]. También pueden ejercer su efecto a través de la inhibición de enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales mediante la competición con la molécula fisiológica. Su eficacia es mayor cuando la división celular es rápida. Estos fármacos se dividen, en función de su semejanza estructural con las moléculas fisiológicas, en: análogos del ácido fólico (como metotrexato y raltitrexed), análogos de purinas (como tioguanina, fludarabina y mercaptopurina) y análogos de pirimidinas (como 5-fluorouracilo, gemcitabina, capecitabina y citarabina).

- Complejos de platino: inhiben la síntesis de ADN al establecer enlaces inter- e intra-catenarios que alteran la estructura tridimensional del ADN. Algunos de los integrantes del grupo actúan como agentes intercalantes. Los principales representantes son cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.
- Inhibidores de la mitosis: se unen a las subunidades de tubulina necesarias para la formación de los microtúbulos que dan lugar al huso acromático durante la fase de mitosis, por lo que actúan durante la fase S o de síntesis del ciclo celular. Pueden ejercer su acción inhibiendo la formación de los microtúbulos al unirse a la tubulina, lo que impide su polimerización (alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), o incrementando su formación dando lugar a estructuras anómalas o excesivamente estables, haciéndolos poco funcionales o impidiendo la desorganización necesaria para la interfase celular (como el grupo de los taxanos al que pertenecen docetaxel y paclitaxel).
- Inhibidores de topoisomerasas: las topoisomerasas son una familia de enzimas que regulan la compactación del ADN. Están implicadas en los procesos de replicación y transcripción celular relajando el superenrollamiento provocado por las enzimas polimerasas [50], produciendo la ruptura y soldadura de las cadenas de ADN [49].
  - Inhibidores de la topoisomerasa I: esta enzima cataliza la rotura y posterior reparación de una de las cadenas de ADN relajando el superenrollamiento positivo y negativo. Estos fármacos se unen covalentemente a la

enzima impidiendo su liberación del ADN, por lo que las enzimas de replicación/transcripción no pueden continuar con su función, causando la rotura de la cadena. En este grupo se incluyen irinotecán y topotecán.

- Inhibidores de la topoisomerasa II: esta enzima rompe simultáneamente las dos cadenas de ADN para eliminar preferentemente el superenrollamiento positivo. Los derivados del podófilo (etopósido y tenipósido) y antibióticos antraciclínicos (doxorubicina, epirubicina, daunorubicina e idarubicina) pertenecen a este grupo.
- Antibióticos citostáticos: su mecanismo de acción es diverso ya que están formados por compuestos de diferente origen y estructura química. Pueden actuar mediante la inhibición de la síntesis de ADN al intercalarse entre las cadenas de ácidos nucleicos, la inhibición de topoisomerasas o alterando la membrana celular.

También existen otros tratamientos antineoplásicos que no pertenecen a la categoría de fármacos citostáticos clásicos o convencionales. Es el caso de antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular como las hormonas (antagonistas de estrógenos, antagonistas de andrógenos, progestágenos y análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante o LHRH), agentes biológicos (interferones, interleukinas y vacunas) o terapias dirigidas con anticuerpos monoclonales, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de tirosin-kinasas e inhibidores de proteasoma [39; 44; 46-48].

#### **1.4.1.2. Peligrosidad de los fármacos citostáticos**

Debido a su mecanismo de acción, los fármacos citostáticos pueden dar lugar a efectos mutágenos, carcinógenos, genotóxicos y teratógenos. Distintas instituciones como la IARC (International Agency for Research on Cancer), perteneciente a la OMS, y el NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health, Center for Disease Control and Prevention) y la FDA (Food and Drug Administration), ambas pertenecientes al U.S. Department of Health and Human Services, han realizado una clasificación de los distintos fármacos antineoplásicos en función de su peligrosidad.

- La IARC clasifica los fármacos en función de su carcinogenicidad en humanos en 4 categorías [51]:
  - Grupo 1: Carcinógeno en humanos.  
Existen suficientes evidencias de carcinogenicidad en humanos.
  - Grupo 2A: Probable carcinógeno en humano.  
Existen limitadas evidencias de carcinogenicidad en humanos pero suficientes evidencias en estudios experimentales en animales o fuertes evidencias mecanísticas; o inadecuada evidencia en humanos, pero suficientes evidencias en animales y fuertes evidencias mecanísticas en estudios experimentales en células o tejidos humanos.
  - Grupo 2B: Posible carcinógeno en humanos.  
En esta categoría se incluyen los compuestos para los que se ha realizado solo una de las siguientes tres evaluaciones: limitada evidencia de carcinogenicidad en humanos, suficiente evidencia en animales o fuerte evidencia mecanística mostrando características clave de carcinógeno en humanos.
  - Grupo 3: No clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos.  
Existen evidencias inadecuadas de carcinogenicidad en humanos, y evidencias limitadas o inadecuadas tanto en estudios experimentales en animales como en estudios experimentales en células o tejidos humanos.

La IARC clasifica como carcinógenos del grupo 1 compuestos como ciclofosfamida y etopósido. Otros fármacos como doxorubicina, dacarbazina y metotrexato pertenecen al grupo 2A, 2B y 3, respectivamente [52].

- El NIOSH, en su última publicación de 2016, clasifica los fármacos en 3 grupos en función de su consideración como “sustancia peligrosa” (“*hazardous drug*”). Son consideradas como “sustancias peligrosas” aquellas que cumplen una o más de las siguientes 6 características en humanos o animales: a) carcinogenicidad, b) teratogenicidad o toxicidad del desarrollo, c) toxicidad reproductiva, d) toxicidad orgánica a bajas dosis, e) genotoxicidad y f) perfiles de estructura y toxicidad similares a fármacos previamente considerados como “peligrosos” [53].
  - Grupo 1: fármacos antineoplásicos considerados peligrosos.
  - Grupo 2: fármacos no antineoplásicos considerados peligrosos.

- Grupo 3: fármacos que poseen un riesgo reproductivo o pueden estar presentes en leche materna.

Se incluyen en el grupo 1 fármacos como gemcitabina, dacarbazina, metotrexato, irinotecán, ciclofosfamida, doxorubicina, epirubicina, etopósido, vinorelbina, docetaxel y paclitaxel.

El término “sustancia peligrosa” fue acuñado por primera vez en 1990 por la American Society of Hospital Pharmacy (ASHP), actualmente conocida como American Society of Health-System Pharmacists [53], para referirse a otros productos farmacéuticos que representaban un peligro para los trabajadores, pero que no se utilizaban en la terapia del cáncer [54; 55]. Este término fue adoptado posteriormente por la Occupational Safety and Health Administration (OSHA), y nombrado por primera vez por el NIOSH en una alerta publicada en el año 2004 [56].

- Por su parte, la FDA clasifica los medicamentos en función de su peligrosidad con respecto al feto, por lo que evalúan el potencial teratogénico de los fármacos estableciendo 5 categorías [57-59]:
  - Categoría A: los estudios controlados en humanos no evidencian daño fetal en el primer trimestre y no existe evidencia de riesgo en los trimestres posteriores.
  - Categoría B: los estudios en animales no han mostrado riesgo y no existen estudios en humanos, o los estudios en animales indican un riesgo para el feto, pero los estudios en humanos no han demostrado dicho riesgo.
  - Categoría C: los estudios en animales han demostrado riesgo fetal, pero no existen estudios en humanos, aunque su potencial beneficio puede justificar su uso; o no se dispone de estudios en animales ni en humanos.
  - Categoría D: existen evidencias de riesgo fetal en humanos, pero no existe otra alternativa terapéutica eficaz y los beneficios pueden superar los riesgos.
  - Categoría X: los estudios en animales o humanos han demostrado daño fetal, o existen evidencias de riesgo fetal basadas en la experiencia, y los riesgos superan claramente los beneficios.

La clasificación de medicamentos de la FDA recoge como fármacos pertenecientes a la categoría C la dacarbazina, en la categoría D fármacos como irinotecán, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido, vinorelbina, docetaxel y paclitaxel, en la categoría X metotrexato, y gemcitabina y epirubicina sin categoría asignada [60].

Este sistema de clasificación ha estado vigente desde 1979; sin embargo, los lectores a menudo no entendían el significado de las categorías de riesgo ya que, según la FDA, era demasiado simplista, conducía a información errónea, podía llevar a falsas asunciones, no informaba de manera eficaz del riesgo durante el embarazo o la lactancia, y no abordaba de manera adecuada la información disponible [61; 62]. Además, estas categorías no consideraban el riesgo que podían presentar los fármacos o sus metabolitos en leche materna. De este modo, en el año 2008, la FDA propuso una nueva regla de etiquetado de los medicamentos en función de su uso en el embarazo [63]. Surgió así, en el año 2014, el documento “Pregnancy and Lactation Labeling (Drugs) Final Rule” [64] en el que se sustituía el antiguo sistema de clasificación por letras por nuevos apéndices con una estructura narrativa en los que se recogía la información disponible de estudios en humanos y animales. Se incluyen 3 secciones (embarazo, lactancia, y mujeres y hombres con potencial reproductivo) en las que se informa de las dosis y riesgos potenciales para el feto, los efectos durante la lactancia y los efectos del medicamento relacionados con la fertilidad y el embarazo; proporcionando además información de contacto y animando a las embarazadas a participar en los registros de exposición durante el embarazo [61]. Este documento se convirtió en obligatorio a partir del 30 de junio de 2015 [65].

#### **1.4.1.3. Efectos adversos**

El hecho de que los fármacos citostáticos se utilicen para provocar un daño celular afecta no solo a las células cancerosas sino también, en mayor o menor medida, a las demás células sanas del organismo, con la consiguiente aparición de efectos adversos. En general, las células sanas más afectadas son aquellas que comparten características con las células neoplásicas, tales como una rápida multiplicación celular [42; 45; 66].

Entre las reacciones adversas más frecuentes destacan la toxicidad de piel y mucosas (prurito, descamación, fotosensibilidad, piel seca, eritema),

reacciones alérgicas como dermatitis y urticaria, toxicidad gastrointestinal (dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea), toxicidad del tracto respiratorio (broncoespasmo, alteraciones del murmullo vesicular), toxicidad hematológica (alteraciones plaquetarias, alteraciones del recuento de células sanguíneas), toxicidad genitourinaria, alteración corneal, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, capacidad hemorrágica, irritante o vesicante, o síntomas tan inespecíficos como mareo, vértigo y cefaleas, entre otros [42; 67].

La toxicidad de los fármacos se puede dividir en 3 tipos en función del momento de su aparición. Así, hablamos de toxicidad inmediata cuando la manifestación se produce horas o días después de la administración (como fiebre, vómitos, reacciones alérgicas...), toxicidad precoz si se produce tras días o semanas (síndrome pseudogripal, mucositis, aplasia medular...), y toxicidad retardada si los signos o síntomas aparecen tras semanas o meses de haber recibido el tratamiento (anemia, fibrosis pulmonar, ototoxicidad, cardiotoxicidad, daño hepatocelular...) [45]. Otro efecto adverso grave que puede producirse tras haber recibido tratamiento con fármacos antineoplásicos, y que puede enmarcarse dentro de la categoría de toxicidad tardía, es la aparición de neoplasias secundarias, siendo las leucemias y el cáncer de vejiga las más frecuentes [30-34; 54; 68; 69]. Los fármacos citostáticos con mayor riesgo de inducir neoplasias secundarias son los agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucilo, melfalán), los inhibidores de la topoisomerasa II (etopósido e irinotecán) y las antraciclinas (doxorubicina, epirubicina y daunorubicina) [45].

Los anticuerpos monoclonales han sido una nueva modalidad de fármacos antineoplásicos introducidos en los últimos años bajo la denominación de agentes biológicos diana-específico, fármacos antidiana o terapias dirigidas. Son fármacos diseñados para reconocer características específicas de las células tumorales, tales como proteínas o mecanismos esenciales para su proliferación y crecimiento. En general, estos nuevos agentes son más selectivos que los fármacos convencionales y, por tanto, generan menos efectos adversos, aunque éstos siguen estando presentes [45].

### **1.5. Exposición ocupacional a fármacos citostáticos en el ambiente hospitalario**

La exposición ocupacional a fármacos citostáticos puede producirse en cualquier etapa durante su manipulación, desde la producción hasta la administración, por lo que comprende todos los procesos implicados en la fabricación del medicamento, distribución, recepción, almacenamiento, transporte, preparación de dosis y administración, hasta incluso el manejo de residuos y excretas de pacientes, cuidado de los pacientes y mantenimiento de los sistemas de protección [43; 66; 70].

Todo el personal sanitario, incluido el personal de limpieza, involucrado en alguna de estas actividades está expuesto a un cierto nivel de riesgo. Los profesionales de mayor riesgo incluyen farmacéuticos, técnicos de farmacia, enfermeros y auxiliares, aunque otros como médicos, cuidadores, celadores, servicio de limpieza, personal administrativo, personal de lavandería hospitalaria o trabajadores sanitarios a domicilio podrían no estar totalmente exentos [66; 71; 72]. Los trabajadores de otras áreas como veterinaria, industrias farmacéuticas, laboratorios médicos o centros de investigación también están expuestos a estos fármacos [72-74].

En el caso de los pacientes, a pesar de que los fármacos citostáticos producen importantes efectos adversos, la relación beneficio/riesgo resulta favorable para su uso; sin embargo, la exposición laboral a estos fármacos puede ocasionar un daño en el organismo de los trabajadores sin que esto les aporte ningún beneficio terapéutico. Otro aspecto a considerar es que mientras los pacientes reciben altas dosis durante períodos de tiempo definidos, los profesionales sanitarios y otros trabajadores hospitalarios se encuentran expuestos a bajas dosis durante períodos prolongados y continuados, encontrándose expuestos en cada jornada laboral durante años de trabajo [66; 75-77].

El uso cada vez mayor de fármacos citostáticos debido al aumento de la carga de cáncer, junto con la utilización de los fármacos en enfermedades no neoplásicas de tipo reumatológico e inmunológico (artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis y lupus eritematoso sistémico) [55; 66; 75], y el uso de terapias combinadas con varios fármacos [78], hacen que el riesgo al que se expone el personal sanitario implicado en el manejo de estos compuestos sea cada vez mayor.

### **1.5.1. Vías de exposición**

Las rutas de exposición más frecuentes son la vía dérmica por penetración del compuesto a través de piel o mucosas, y la vía inhalatoria por aspiración de partículas, aerosoles o vapores suspendidos en el aire durante el proceso de preparación o administración. Otras rutas de exposición menos habituales, aunque no por ello menos importantes, son la vía oral por ingestión de alimentos o bebidas contaminadas o por contacto mano-boca debido a la exposición a superficies u objetos contaminados, y la vía parenteral por introducción directa en el organismo debido a cortes o pinchazos [39; 42; 43; 54; 55; 66; 70; 77; 79-82].

### **1.5.2. Efectos adversos en trabajadores expuestos**

El aumento de la preocupación sobre el posible riesgo de los trabajadores sanitarios en contacto con fármacos citostáticos se acentuó a finales de los años 70 tras la publicación de un trabajo en el que se evidenciaba la presencia de compuestos con capacidad mutagénica en la orina de enfermeras expuestas a fármacos citostáticos [83]. Una encuesta elaborada por Tortorici et al. (1980) [84] en centros oncológicos de EE.UU. evidenciaba la inquietud de los trabajadores por los posibles riesgos derivados de derrames de compuestos antineoplásicos sobre la piel, y de la posible inhalación de vapores durante la etapa de preparación. Estudios posteriores también evidenciaron la presencia de actividad mutagénica en la orina del personal de farmacia encargado de realizar las preparaciones, utilizando para ello cabinas de flujo horizontal [85; 86]; y en enfermeras, las cuales no utilizaban cabinas ventiladas para la preparación de los fármacos [87]. Esta capacidad mutagénica en la orina había sido descrita por primera vez por Siebert y Simon (1973) [88] en la orina de pacientes a tratamiento con ciclofosfamida, lo que sugiere que los trabajadores en contacto con estos fármacos también pueden estar sufriendo los efectos adversos.

Numerosos estudios han evaluado la aparición y/o el riesgo de efectos adversos en farmacéuticos, técnicos de farmacia, enfermeros y auxiliares de enfermería en contacto con fármacos antineoplásicos. Los efectos adversos pueden abarcar desde reacciones agudas y a corto plazo, hasta efectos crónicos debidos a la exposición continuada (tales como daño en los órganos, daño en la médula ósea o infertilidad), toxicidad reproductiva, y efectos teratogénicos [54; 55; 66; 70].

En estudios controlados, las reacciones agudas significativamente más frecuentes en trabajadores expuestos en comparación con controles fueron pérdida de pelo, erupción/irritación cutánea, mareo, tos crónica, diarrea, dolor de cabeza, irritación ocular, irritación de boca y garganta, dolor abdominal y náuseas y vómitos [87; 89-94]. Muchos de estos efectos se asociaron positivamente con el contacto dérmico, el cual produce un incremento significativo de los síntomas [90; 95]. Distintos trabajos informaron de casos particulares en los que se detectaron síntomas tras la manipulación de fármacos citostáticos tales como reacciones alérgicas [96]; rinorrea, disnea y ataques de tos que desencadenaron en un cuadro de asma alérgica [97]; estornudos, ojos hinchados, sofocos, dificultad respiratoria, opresión en el pecho y congestión tras haber preparado vincristina en una cabina de flujo laminar horizontal, y angustia abdominal, eructos, diarrea explosiva acompañada de dolor abdominal, y vómitos tras haberse producido el derrame de una preparación de carmustina sobre la piel [98]; y mareos y enrojecimiento de la cara en farmacéuticos que preparaban dacarbazina y cisplatino [99]. En Grecia, un trabajo realizado por Constantinidis et al. (2011) [100] informaba de efectos adversos en el sistema nervioso central (mareos, náuseas y dolor de cabeza) y en el aparato respiratorio (asma, tos y quemazón), e irritación dérmica, encontrándose la mayoría de los síntomas relacionados positivamente con el número de preparaciones y la existencia de accidentes. Por su parte, Ivanova et al. (2016) [91] encontraron una relación significativa entre la duración de la exposición y la aparición de síntomas. Además, estos efectos tienden a desaparecer tras varios días libres de exposición [87; 89].

En relación con los efectos crónicos derivados de la exposición laboral a agentes antineoplásicos, diversos trabajos han relacionado la manipulación de estos fármacos por parte del personal de enfermería y farmacia con un aumento significativo del riesgo de infertilidad [101; 102]. El riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer en general [102], o ciertos tipos en particular como leucemia [103], o cáncer de mama y cáncer de recto [104], ha sido significativamente mayor en el personal sanitario expuesto en comparación con el grupo control, mostrando una asociación positiva con la duración de la exposición. Levin et al. (1993) [105] identificaron un caso de carcinoma de vejiga en una farmacéutica encargada de la elaboración de las preparaciones utilizando una cabina de flujo horizontal. Otro efecto adverso relacionado con la exposición a largo plazo es el daño producido en distintos órganos. En

este aspecto, Sotaniemi et al. (1983) [106] han informado de 3 casos en los que se detectó daño hepático con fibrosis irreversible en jefas de enfermería, así como síntomas neurológicos como dolor de cabeza y debilidad, sugiriendo una asociación positiva entre la intensidad y la duración de la exposición con el desarrollo de daño hepático.

La exposición de las trabajadoras a fármacos citostáticos antes o durante el embarazo también ha sido investigada por diversos autores, encontrando una asociación estadísticamente significativa entre la exposición y la frecuencia de abortos espontáneos (odds ratio (OR)= 1,001-2,86) [87; 102; 107-109], nacimientos pretérmino (OR= 1,75-5,04) [102], bajo peso al nacer (OR= 0,9-4,7) [110] y pérdida fetal (OR= 1,20-4,39) [111]. También se han documentado efectos teratogénicos como malformaciones congénitas (OR= 1,08-11,14) [87; 102; 104], defectos de nacimiento en sistema nervioso, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, urogenital o músculo-esquelético (riesgo 2-5 veces mayor en expuestos) [112], y dificultades de aprendizaje (motor, cognitivo y habla) [102]. Sin embargo, muchos de estos efectos no han podido ser demostrados en otros estudios, o lo han hecho parcialmente, dando lugar a resultados contradictorios [103; 104; 108; 110; 113; 114].

Por último, estudios citogenéticos han revelado un incremento de marcadores de daño genético como aberraciones cromosómicas [77; 115-120], micronúcleos [77; 115; 116; 118-126], intercambio de cromátidas hermanas [116; 119; 125; 127] y daño primario en el ADN (roturas de cadena y sitios lábiles alcalinos) [121; 122; 126; 128; 129] en el personal sanitario en contacto con antineoplásicos, como farmacéuticos, técnicos, enfermeros y auxiliares, en comparación con el grupo control. McDiarmid et al. (2010) detectaron un exceso significativo de anomalías en los cromosomas 5 y 7 en farmacéuticos, técnicos y enfermeros oncológicos en comparación con el grupo control. Estas alteraciones están relacionadas con el desarrollo de leucemias y síndromes mielodisplásicos en pacientes tras haber recibido tratamiento con agentes alquilantes o inhibidores de topoisomeras [130]. Por el contrario, algunos autores no encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para los marcadores evaluados [131-139], o solo confirmaron algunos de ellos [140-144], lo que sugiere que las prácticas de trabajo juegan un papel muy importante en la exposición a estos fármacos durante su manipulación.

### 1.5.3. Guías y recomendaciones para el manejo de fármacos peligrosos

Dada la gravedad de los efectos secundarios y la elevada prevalencia de uso de estos fármacos, múltiples organizaciones profesionales y agencias gubernamentales de diversos países han publicado guías y recomendaciones para el manejo seguro de medicamentos peligrosos en general, y para fármacos antineoplásicos en particular. Las primeras guías publicadas pertenecen a agencias americanas y canadienses como la de la American Society of Health-System Pharmacists (ASHP) en 1985 [145], el National Institute of Health de EE.UU. (NIH) en 1983 [146], la Occupational Safety and Health Administration de EE.UU. (OSHA) en 1986 [147], la Oncology Nursing Society (ONS) en 1982 [148], la American Medical Association's Council on Scientific Affairs (AMACSA) en 1985 [149] y la Canadian Society of Hospital Pharmacists en 1981 [150]. Destaca también la alerta emitida por el NIOSH en el año 2004 [55] con el objetivo de incrementar la conciencia entre los trabajadores sanitarios sobre los riesgos que implica el trabajo con fármacos peligrosos y proporcionarles recomendaciones para protegerse. Esta guía no solo proporcionaba recomendaciones y pautas de trabajo para el manejo de fármacos peligrosos, sino que también recogía evidencias científicas que reflejaban los riesgos que implica su manejo. Por ello, esta guía sirvió como base para otras guías posteriores y para el establecimiento de dichas recomendaciones como requisitos exigibles, recogidos en Farmacopeas, como los incluidos en los capítulos 797 y 800 de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) relativas a la preparación de formulaciones estériles y el manejo de fármacos peligrosos, respectivamente [151; 152].

A nivel europeo, la Directiva 89/391/CEE del Consejo, relativa a la aplicación de medidas para promover la mejora de la seguridad y la salud de los trabajadores [153], ha servido de base para distintas normativas relacionadas con la exposición ocupacional de los trabajadores a agentes químicos (Directiva 98/24/CE del Consejo [154]) o a agentes mutágenos o cancerígenos (Directiva 2004/37/CE de Parlamento Europeo y del Consejo del año 2004 [155]), aunque su ámbito de aplicación se extiende a cualquier profesión y sustancia o material peligroso. Estas normativas tiene carácter vinculante y los Estados miembros deben trasponerlas a las leyes nacionales [156]. También se han establecido unos estándares de consenso publicados en 2007 por la Sociedad Internacional de Farmacéuticos Oncológicos (ISOPP), formada por expertos de diversos países en el manejo de antineoplásicos,

con el objetivo de desarrollar unas prácticas de trabajo a nivel internacional para el manejo seguro de sustancias citotóxicas [39; 157]; así como recomendaciones aprobadas por el Parlamento Europeo con el propósito de proteger a los trabajadores sanitarios en su lugar de trabajo frente a fármacos citotóxicos y demás sustancias peligrosas [66]. Sin embargo, no todos los estados miembros de la Unión Europea han adoptado los estándares establecidos por la ISOPP, por lo que en algunos países los estándares exigidos no alcanzan el mismo nivel de protección o simplemente no existen, o han adoptado guías elaboradas por científicos o asociaciones nacionales que no han sido respaldadas por sus respectivos gobiernos [66].

En España, antes de la publicación de los estándares ISOPP en 2007, se habían publicado diversas guías de buenas prácticas elaboradas por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), perteneciente al Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, relativas a la exposición laboral a fármacos citostáticos. En ellas se recogen medidas de protección y procedimientos de actuación recomendados para la manipulación de agentes citostáticos [44; 158]. También estaba disponible una guía en la que se recogían las características de los distintos tipos de cabinas de seguridad biológica, aunque no hace mención alguna a los fármacos antineoplásicos [159]. Destacan también los Protocolos de Vigilancia Sanitaria Específica, del Ministerio de Sanidad y Consumo, publicados en el año 2003, en los que se aborda por primera vez y de manera extensa el manejo de fármacos citostáticos, desde las posibles fuentes de exposición, vías de penetración y efectos tóxicos sobre la salud, hasta las medidas de protección ambiental y personal, las normas de trabajo, la evaluación del riesgo ambiental y biológico, y finalmente la vigilancia de la salud [42]. Más recientemente destaca otra publicación de carácter general para la manipulación de fármacos peligrosos [56], actualmente descatalogada, y otra enfocada al manejo de fármacos antineoplásicos en los servicios de farmacia hospitalaria [43], ambos elaborados por el INSHT. El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST), anteriormente INSHT, también ha publicado guías de buenas prácticas para la preparación y administración de fármacos peligrosos en las que se recogen las características y condiciones que deben cumplir los dispositivos requeridos para llevar a cabo estas operaciones [160; 161]. Además, la Real Farmacopea Española también incluye el manejo seguro de fármacos antineoplásicos en sus monografías de preparaciones parenterales estériles [162]. Otras guías

son elaboradas por asociaciones comunitarias como la de la Asociación Madrileña de Medicina del Trabajo en el Ámbito Sanitario (AMMTAS) [163]. Sin embargo, otros muchos documentos están más enfocados hacia la calidad de la atención al paciente y la prevención de errores de medicación que en la seguridad del manejo de fármacos peligrosos [39].

### **1.5.3.1. Límites de exposición**

Numerosas agencias han establecido límites de exposición a sustancias peligrosas. Destacan los “Límites Permisibles de Exposición” (PEL, por sus siglas en inglés) establecidos por la OSHA, los “Límites Recomendados de Exposición” (REL) del NIOSH, los “Valores Umbral Límite” (TLV) de la Conferencia Gubernamental Americana de Higienistas Industriales (ACGIH), o los “Niveles de Exposición Ambiental en el lugar de Trabajo” (WEEL) de la Asociación Americana de Higiene Industrial (AIHA) [40; 55].

Por su parte, la Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo (EU-OSHA) en colaboración con la Dirección General de Empleo, Asuntos Sociales e Inclusión de la Unión Europea (DG-EMPL), y la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA) (que reemplaza al Comité Científico sobre Límites de Exposición Ocupacional (SCOEL)), y con la capacidad legislativa del Parlamento Europeo, han propuesto también “Valores Límite de Exposición Ocupacional” (OELV), que pueden presentar carácter vinculante o indicativo, y que vienen recogidos en la Directiva 98/24/EC de agentes químicos [154], y la Directiva 2004/37/EC de carcinógenos y mutágenos [155]. Otras Directivas posteriores, como la Directiva 2017/2398 [164] o la Directiva 2019/1831/EC [165], han añadido sucesivas actualizaciones con valores límite de exposición para nuevos productos. Sin embargo, estos valores solo han sido establecidos para un limitado número de sustancia peligrosas entre las que no se incluyen los agentes citostáticos, y solo son aplicables para evaluar la contaminación ambiental en el aire. Por tanto, dado que la contaminación por citostáticos se produce mayormente en superficies, estos límites tampoco serían adecuados para monitorizar el ambiente de trabajo en el sector sanitario.

Algunos autores han propuesto el establecimiento de “Límites de Exposición Ocupacional Dérmica” (DOEL) para compuestos como MDA (4,4'-metilendianilina) o ciclofosfamida [166]. Por otro lado, se han establecido también “Valores Biológicos Límite” (BLV) y “Valores Biológicos Orientativos”

(BGV) para ciertos productos como plomo y níquel, entre otros, en sangre y orina, respectivamente [167; 168].

Sin embargo, no se dispone de valores de exposición para fármacos antineoplásicos debido a la falta de consenso sobre los marcadores a evaluar, la metodología analítica a utilizar y la escasez de evidencias científicas que permitan correlacionar los niveles de exposición con el riesgo de aparición de efectos adversos [40; 66]. Además, las evidencias científicas obtenidas hasta el momento no permiten identificar niveles de exposición por debajo de los cuales no existe riesgo de efectos adversos sobre la salud, aunque sí se recoge la existencia de una relación exposición-probabilidad del efecto, lo que permite deducir que a menor exposición menor será el riesgo [169].

A nivel del territorio nacional, dado que el Artículo 3 punto 3 de la Directiva Europea 98/24/CE imponía que *“los Estados miembros establecerán un valor límite de exposición profesional nacional para todo agente químico que tenga fijado un valor límite indicativo de exposición profesional a escala comunitaria”*, se han publicado distintas normativas en el Boletín Oficial del Estado tales como el Real Decreto 665/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo [170], y el Real Decreto 374/2001 sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo [171], así como la publicación anual de los límites de exposición a agentes químicos en España por parte del INSST desde 1999 [169]. Sin embargo, en estas guías siguen sin mencionarse los compuestos citostáticos o antineoplásicos, así como tampoco lo especifica el Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas [172] o el Real Decreto 363/95 [173].

Por tanto, debido a que no se han establecido niveles de exposición ocupacional para agentes antineoplásicos, la estrategia a utilizar es seguir el principio ALARA (*“As Low As Reasonably Achievable”*), basado en conseguir unos niveles de exposición tan bajos como sea posible [131; 155; 174-178].

#### **1.5.4. Medidas preventivas para el manejo de fármacos antineoplásicos**

Las guías elaboradas incluyen consejos sobre las condiciones en las que deberían realizarse cada una de las etapas del proceso, desde la recepción y almacenamiento de los fármacos hasta la administración, incluyendo las

etapas de limpieza y eliminación de residuos, así como la técnica a utilizar, y las características y requerimientos de las zonas donde se realizan dichas operaciones.

Entre las medidas preventivas recomendadas para la manipulación de fármacos peligrosos, y en particular agentes antineoplásicos, se incluyen: 1) controles de ingeniería, 2) controles administrativos y 3) equipos de protección individual (EPIs) [42; 43; 55; 66; 70; 157].

Estos 3 niveles de protección son necesarios para minimizar el riesgo de exposición a estos fármacos, y deben seguir un orden jerárquico según estipula la Directiva 98/24/CE del Consejo Europeo, la Directiva 2004/37/CE y los estándares ISOPP [154; 155; 157]. Un nivel inicial adicional consistiría en la eliminación o sustitución por un agente de menor riesgo, pero dado que se trata de fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no se dispone de alternativas más seguras, este nivel no tiene cabida como medida de prevención en este contexto. En conjunto, los 4 niveles se conocen como estrategia STOP [179].

#### **1.5.4.1. Controles de ingeniería**

Este tipo de medidas incluyen distintos sistemas y medidas de protección colectiva:

- Uso de una área especialmente destinada a la preparación de fármacos antineoplásicos. Esta área deberá estar aislada del resto de zonas de trabajo, su acceso estará restringido al personal autorizado, y constará de 3 zonas diferenciadas: una sala destinada al almacenamiento y acondicionamiento del material, una zona de trabajo propiamente dicha, y una zona de paso o antesala entre ambas que servirá de barrera frente a la contaminación. Esta zona de paso será utilizada por los trabajadores para colocar todo el equipo de protección necesario para entrar en la zona de trabajo, y para sacarlo cuando vaya a dirigirse hacia la sala de almacenamiento. Asimismo, esta zona de paso servirá de zona neutral, impidiendo la comunicación directa de la zona de trabajo con el exterior. Además, se recomienda que tanto la zona de paso como la zona de preparación tendrán la consideración de zonas limpias, para

lo cual deben cumplir una serie de requisitos en cuanto a presión, temperatura, humedad, limpieza del aire y diseño [43].

- Cabinas de seguridad biológica (CSB) de clase II, preferiblemente de tipo B, o clase III, también conocidas como aisladores. Las CSB de clase II son cabinas de flujo laminar vertical que proporcionan una triple protección ambiental, al manipulador y al producto, trabajando a presión negativa y utilizando filtros HEPA. Por su parte, los aisladores crean una zona de trabajo completamente aislada y hermética.
- Uso de sistemas cerrados de transferencia de fármacos. Estos dispositivos impiden la entrada de contaminantes ambientales en el sistema y la salida de vapores o aerosoles al exterior.

#### **1.5.4.2. Controles administrativos**

- Elaboración de protocolos de trabajo.
- Optimización del proceso para reducir el tiempo de exposición y el personal expuesto.
- Programas de concienciación del personal.
- Sesiones de entrenamiento y manejo de los distintos equipos y sistemas de protección.

#### **1.5.4.3. Equipos de protección individual**

- Guantes: se recomienda doble par de guantes o guantes específicos para citostáticos.
- Bata: estéril de un solo uso, con abertura trasera, mangas largas y puños elásticos.
- Mascarilla: autofiltrante tipo FFP3, que permita protección frente a aerosoles.
- Gorro y calzas: siempre que se vaya a entrar en la zona de trabajo de antineoplásicos.

#### **1.5.5. Monitorización de la exposición**

A pesar de la existencia de guías y recomendaciones, y de la utilización de sistemas de protección para el manejo de fármacos peligrosos, se siguen evidenciando indicios de exposición. Por ello, la vigilancia y control de la exposición es otra medida fundamental para ayudar a minimizar los riesgos

derivados del manejo de sustancias peligrosas y asegurar que se consigue una adecuada contención con el uso de los sistemas y medidas de protección y prevención utilizados. Esta exigencia viene recogida en el Artículo 6 de la Directiva 98/24/CE [154]. Además, se ha demostrado que la existencia de campañas rutinarias de monitorización presenta un efecto positivo en la reducción de los niveles de contaminación y sirve para evaluar la efectividad de los programas de prevención utilizados [66; 70; 180].

Los programas de monitorización se basan en la utilización de biomarcadores para determinar el nivel de exposición o la existencia de riesgo. El término “biomarcador”, en su sentido amplio, se utiliza para referirse a la medida de la interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo físico, químico o biológico [181; 182]. De este modo, se pueden diferenciar 3 tipos de biomarcadores diferentes: de exposición, de efecto y de susceptibilidad.

#### **1.5.5.1. Biomarcadores de exposición**

Los biomarcadores de exposición permiten evaluar la exposición directa de los trabajadores mediante la determinación analítica de los fármacos y/o metabolitos en muestras biológicas o, de forma indirecta, mediante la determinación de la contaminación del aire y superficies de trabajo.

Los biomarcadores de exposición biológica son sustancias exógenas o sus metabolitos, o el producto formado por la interacción del xenobiótico y una molécula o célula diana, que se miden en un compartimento dentro del organismo [181]. Esta medición puede realizarse en cualquier muestra biológica incluidas heces, tejidos humanos o aire espirado [182; 183]. En el campo de la exposición ocupacional, la sangre y la orina suelen ser los medios biológicos más frecuentemente utilizados para medir biomarcadores de exposición, aunque el pelo también ha desempeñado un papel destacado como matriz en la determinación de exposición a largo plazo a diversas sustancias químicas como metales pesados, contaminantes ambientales y retardantes de llama, entre otros muchos, tanto en el ámbito laboral como en estudios de monitorización de exposición a ambientes contaminados [184-189]. Estos biomarcadores pueden resultar de gran utilidad en la evaluación de la adecuación y cumplimiento de las medidas utilizadas para reducir la exposición.

Los marcadores de exposición ambiental son aquellos que sirven para determinar la presencia del agente potencialmente peligroso en el entorno de trabajo y evaluar así el nivel de riesgo al que se encuentra expuesto el trabajador, es decir, la carga de la exposición. Estos marcadores suelen ser los propios agentes peligrosos utilizados en el trabajo, los cuales se miden directamente en distintos tipos de muestra para proporcionar una visión conjunta del riesgo. Estas muestras suelen ser las distintas superficies de trabajo (CSB, suelos, estanterías, mesas, bombas de infusión, viales y bolsas intravenosas, etc), equipos de protección individual (guantes, bata, máscara), muestras de aire, o almohadillas o tejidos colocados sobre la superficie corporal o sobre los EPIs.

#### **1.5.5.1.1. Biomarcadores de exposición biológica**

En los estudios publicados hasta la fecha para la evaluación de la exposición profesional a fármacos citostáticos entre el personal sanitario, la matriz biológica utilizada con mayor frecuencia fue la orina, debido a que es una muestra cuya toma es sencilla y no invasiva, con una amplia ventana de detección, y los analitos se encuentran en concentraciones superiores a las detectadas en otras matrices biológicas. Los biomarcadores más frecuentemente monitorizados fueron ciclofosfamida sola o en combinación con ifosfamida, metotrexato,  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (biomarcador de 5-fluorouracilo) y platino. Otros biomarcadores menos frecuentes fueron doxorubicina/epirubicina, paclitaxel, etopósido, irinotecán o dacarbazina. La mayoría de estos estudios solo incluyen unos pocos biomarcadores. Las técnicas instrumentales utilizadas fueron variadas, desde equipos de cromatografía de gases o de líquidos, voltimetría, plasma acoplado inductivamente (ICP) o inmunoensayos, hasta diferentes sistemas empleados para la detección, como espectrómetros de masas simples o en tándem, detectores de captura electrónica (ECD) o ultravioleta. Esta variabilidad da lugar a límites de detección muy amplios, desde 2,5 pg/mL hasta valores de 8100 pg/mL. Los resultados también varían considerablemente según el estudio tanto en el porcentaje de muestras positivas como en los valores detectados. Los valores obtenidos oscilaron entre 0% y 55% de las muestras analizadas, y 0% y 80,8% de los trabajadores participantes, con unas concentraciones comprendidas entre 10 pg/mL y 84,1 ng/mL, según el compuesto analizado. La **Tabla 1** recoge las características de algunos estudios tales como el número de participantes,

los compuestos evaluados, las medidas de protección empleadas, el método de muestreo, la instrumentación analítica utilizada y los resultados obtenidos.



**Tabla 1:** Estudios en los que se evalúa la exposición biológica a fármacos citostáticos en la orina de trabajadores.

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (µg/mL)	% positivos	Rango Concentración (µg/mL)
Hirst et al. (1984) [190]; Canadá	2	Enfermeros	Ciclofosfamida	-	Orina	GC-NPD LOD= 250-300 ng	Muestras positivas	CP= 0,35-9,08 µg
Evelo et al. (1986) [191]; Países Bajos	20	Expuestos	Ciclofosfamida	-	Orina 24 horas desde inicio	GC-MSD LOD= 0,5 µg/24h	25% (5/20)	CP= 0,7-2,5 µg/24h
Sessink et al. (1991) [192]; Países Bajos	2	Técnicos	Ciclofosfamida	Cabina flujo laminar clase II, guantes	24 horas tras preparación	GC-MS LOD= 1000	0% (0/29)	-
Sessink et al. (1992) [193]; Países Bajos	25	Técnicos, Enfermeros	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Cabina flujo vertical, guantes, máscara, gorro (solo técnicos)	24 horas desde inicio de turno (análisis fraccionado)	GC-MS/MS LOD= 100	32% (8/25 trabajadores)	CP= 0,04-0,5 µg
Ensslin et al. (1994) [194]; Alemania	21	Farmacéuticos, Técnicos, Enfermeros (8 hospitales)	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Cabina flujo vertical, guantes	24 horas tras primer manejo	GC-ECD LOD= 2,5 µg/24h	CP= 38,3% (18/47) IF= 18,9% (7/37)	CP= 3,48-38,23 µg/24h IF= 5,05-12,74 µg/24h
Sessink et al. (1994a) [80]; Países Bajos	9	Técnicos	Ciclofosfamida	Cabina flujo vertical, guantes, gorros, batas	24 horas desde inicio de turno (análisis fraccionado)	LOD= 200	66,7% (6/9 trabajadores)	CP= 0,2-19,4 µg/24h

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Sessink et al. (1994b) [195]; Países Bajos	11 + 30	Trabajadores industria + Controles	Metotrexato	Guantes, máscara, botas, gorro, ropa protectora	Orina 72-96 horas desde inicio	FPIA LOD= 0,01 µM	1000% (trabajadores)	MTX= 6,1-24 µg
Mader et al. (1996) [196]; Austria	10 + 5 + 10 + 3	Preparación + Administrativos + Enfermeros + Otros	Metotrexato	Cabina flujo, guantes, máscara protectora	Orina 36 horas	HPLC- LOD= 4 ng	28,6% (8/28 participantes)	MTX máx= 12,8-2348 ng/mL MTX= 6,39-1416 µg/36h
Ensslin et al. (1997) [197]; Alemania	13	Farmacéuticos, Técnicos	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Platino	Cabina flujo vertical, guantes, bata	24 horas desde final de turno	CP, IF -> GC-ECD Pt -> Voltametría LOD= 4-2500	-	CP= 5.000-9.000
Minoia et al. (1998) [198]; Italia	24	Preparación, Administración (2 hospitales)	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Cabina flujo vertical, uniforme, bata, guantes, máscara quirúrgica	Al inicio Al final	HPLC-MS/MS LOD= 50	CP --> 50% (12/24 trabajadores) IF --> 8,3% (2/24 trabajadores)	CP= 110-2100 IF= 810-1000
Sottani et al. (1998) [199]; Italia	24	Preparación, Administración (2 hospitales)	Ciclofosfamida	Cabina flujo vertical, guantes, máscara, bata	Al inicio Al final 3 días consecutivos	HPLC-MS/MS LOD= 50	62,5% (15/24 trabajadores)	CP= 50-2129
Hessel et al. (2001) [134]; Alemania	-	-	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Doxorubicina, Epirubicina, Cis-Pt, Carbo-Pt	-	-	CP, IF -> GC-MS Doxo, Epi->HPLC Pt -> Voltametría (1,4 pg/L) LOD= 4,5-40	-	-

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Turci et al. (2002) [200]; Italia	17	Técnicos de farmacia, Enfermeros (cada trabajador prepara y administra)	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metotrexato, Platino	Cabina flujo vertical, bata, guantes, máscara	Al inicio Durante el turno Al final	*HPLC-MS/MS LOD: CP= 50 IF= 50 MTX= 200 *ICP-MS LOD Pt= 1	29% (18/62) 1,6% (1/62) 0% (0/62) 4,8% (3/62)	CP= 50-10031 IF= 150 Pt= 920-1300
Ziegler et al. (2002) [201]; Reino Unido	-	Administración, Cuidado paciente + no expuestos	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metotrexato, Platino	Guantes	Al final	CP, IF --> GC-MS MTX --> Inmuno Pt --> ICP-MS LOD= 9-2000 pmol/L	0%	-
Pethran et al. (2003) [202]; Alemania	100	Técnicos, Enfermeros (14 hospitales)	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Doxorubicina, Epirubicina, Daunorubicina, Idarubicina, Cis-Pt, Carbo-Pt	Cabina flujo vertical, guantes	24 horas tras 3 días de trabajo 3 muestreos	CP+IF --> GC-MS Doxo, Epi, Dauno, Ida --> HPLC Pt --> Voltametría  LOD CP, IF= 40; Doxo= 4,5; Epi= 6,1; Dauno= 35; Ida= 11,5; Pt= 1	CP= 7,5% (106/1415) IF= 2,6% (37/1415) Doxo= 1,9% (34/1752) Epi= 2,6% (45/1752)	CP= 50-760 IF= 80-1900 Doxo= 5-127 Epi= 10-182 Pt=1,4-107

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Wick et al. (2003) [203]; EE.UU.	7 + 1  Antes y después de CSDTD	Farmacéuticos, Técnicos, Enfermeros + Control	Ciclofosfamida, Ifosfamida	CSB clase II tipo A/B3, CSDTD, bata, gorro, guantes, máscara	24 horas (análisis fraccionado)	HPLC-MS/MS LOD= 0,1 ng	CP= 75% (6/8 trabajadores) IF= 25% (2/8 trabajadores) CP= 34,6% (18/52) IF= 19,2% (10/52)  Tras CSDTD 0%	CP= 241->1110 IF= >910->1430
Barbieri et al. (2005) [204]; Italia	50	Enfermeros	Ciclofosfamida, Metotrexato	-	Al final	HPLC-MS/MS LOD CP= 60 LOD MTX= 200	38% (19/50 participantes) CP= 16% (5/50) MTX= 32% (16/50)	CP= 60-10000 MTX= 300-2000
Mason et al. (2005) [205]; Reino Unido	-	Preparación + Control	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metotrexato, Cis-Pt, Carbo-Pt	Aisladores, sala clase D, guantes, bata	Al inicio Al final	CP, IF -> GC-MS MTX -> Inmuno Pt -> ICP-MS LOD= 22-10000 pmol/L	0% (CP, IF, MTX) Pt expuestos > controles	-
Barbieri et al. (2006) [206]; Italia	-	Preparación, Administración	Ciclofosfamida, Metotrexato	-	Al final	HPLC-MS/MS LOD CP= 40 LOD MTX= 200	Total= 43,3% (13/30) CP= 20% (6/30) >LOQ MTX= 10% (3/30) >LOQ	CP= 80-250 MTX= 400-580
Fransman et al. (2007) [207]; Países Bajos	Año 1997 --> 26  Año 2000 --> 13	Enfermeros	Ciclofosfamida	Guantes, CSDTD	24 horas desde inicio de turno (análisis fraccionado)	GC-MS/MS LOD= 100	1997 --> 8,5% (61/717) 2000 --> 2,4% (7/294)	*1997 --> CP= 10-1280 ng/24h *2000 --> CP= 14-45 ng/24h

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Ikeda et al. (2007) [208]; Japón	12	Farmacéuticos	Epirubicina	CSB II tipo B, CSDTD, Luer-lock, bata, guantes, máscara, área centralizada	Orina	HPLC-fluorescencia LOQ= 2000	0%	-
Nyman et al. (2007) [209]; EE.UU.	11 Antes y después de CSDTD	Farmacéuticos, Técnicos, Enfermeros	Ciclofosfamida, Ifosfamida	CSB clase II B2, sala limpia, CSDTD, EPIs	24 horas desde final de turno (análisis fraccionado)	HPLC-MS/MS	9,1% (1/11 trabajadores)	-
Rekhadevi et al. (2007) [126]; India	52	Enfermeras	Ciclofosfamida	-	Al inicio tras 6 días de trabajo	GC-MS LOD= 40	80,8% (42/52 trabajadores)	CP= 0,08-0,9 ug/mL
Hedmer et al. (2008) [210]; Suecia	22	Preparación, Administración, Otros (cuidadores, limpieza)	Ciclofosfamida, Ifosfamida	CSB clase II EPIs, área centralizada, presión negativa	Al inicio Al final	LC-MS/MS LOD CP= 10 LOD IF= 30	0%	-
Sottani et al. (2008) [211]; Italia	20	Farmacéuticos, Técnicos, Enfermeros	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina	-	Al inicio Tras 6 horas al acabar	HPLC-MS/MS LOD= 100-200 pg/mL	5% (1/20)	CP= 220
Connor et al. (2010) [212]; EE.UU.	68 + 53	Farmacia, Enfermería + Controles	Ciclofosfamida, Paclitaxel	CSB clase II tipo A2-B2, CSDTD	Muestras desde 4 horas antes de acabar Muestras hasta 4 horas tras acabar	HPLC-MS/MS LOD= 15	2,5% (3/119)	CP= 0,043-0,079 Pacli= 0,01

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Maeda et al. (2010) [213]; Japón	9	Farmacéuticos, Enfermeros	Ciclofosfamida, Ifosfamida	CSB	24 horas + Puntual	LOD= 400	0%	-
Pieri et al. (2010) [214]; Italia	56	Enfermeros	Doxorubicina, Epirubicina	Cabina flujo vertical, EPIs	Al final	HPLC-fluorescencia LOD Doxo= 600 LOD Epi= 1200	Doxo= 3,6% (2/56) Epi= 5,4% (3/56)	Doxo= 17000-33900 Epi= 42000 - 84100
Sottani et al. (2010) [178]; Italia	Monitorización 10 años	Técnicos farmacia (5 hospitales)	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Doxorubicina, Epirubicina	CSB clase II, gorro, bata, guantes	Al inicio Tras 6 horas al final	HPLC-MS/MS LOQ= 20-200	CP= 0-80% IF= 0-60% Doxo= 0-8% Epi= 0-8%	CP= 27-6113 IF= 27-4221 Doxo= 34-834 Epi= 23-763
Hama et al. (2011) [215]; Japón	1	Farmacéutico dispensación	Ciclofosfamida	No EPIs	29 horas	GC-MS/MS LOD= 10	14,3% (1/7)	CP = 50
Moretti et al. (2011) [216]; Italia	80 + 80	Enfermeras + Controles	Ciclofosfamida	-	4 horas desde inicio hasta final	LC-MS/MS LOD= 10	-	-
Sugiura et al. (2011a) [217]; Japón	41	Farmacéuticos, Enfermeros, Médicos (6 hospitales)	Ciclofosfamida	-	24 horas	GC-MS/MS	32,6% (90/276) 56.1% (23/41 trabajadores)	CP= 2,7-462,5 ng/24h
Sugiura et al. (2011b) [218]; Japón	10	Farmacéuticos, Enfermeros, Médicos	Ciclofosfamida	CSB	24 horas	GC-MS/MS LOD= 10	17,7% (11/62) 30% (3/10 trabajadores)	CP= 20-90

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Turci et al. (2011) [219]; Italia	102 Monitorización 5 años (2003-2007)	Preparación, administración, anestesista, cirujanos (7 hospitales)	Ciclofosfamida, FBAL, Gemcitabina, Doxorubicina, Epirubicina, Daunorubicina, Idarubicina, Platino	CSB clase II (extracción total), antesala, CSDTD, guantes y bata	Al inicio Durante el turno Al final	HPLC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV Pt -> ICP-MS LOQ: CP= 20; Gem= 200, Doxo/Epi= 100; Dauno/Ida= 30; Pt= 0,4; FBAL= 2000	0% (0/207)	-
Villarini et al. (2011) [133]; Italia	40	Preparación, Transporte, Administración, Limpieza	Ciclofosfamida	EPIs	Al final	GC-MS LOD= 100	17,5% (7/40 trabajadores)	CP= 100-1200
Yoshida et al. (2011) [220]; Japón	17	Farmacéuticos (5 hospitales)	Ciclofosfamida, Platino	CSB clase II tipo A1/A2, CSDTD, EPIs	24 horas desde manejo	CP -> GC-MS Pt -> ICP-MS LOD CP= 0,1 ng LOD Pt= 2 ng	17,6% (3/17 trabajadores)	CP= 6,7-52 ng/24h
Sottani et al. (2012) [221]; Italia	11 + 25	Técnicos farmacia + personal enfermería	Gemcitabina, Ciclofosfamida, Ifosfamida	CSB clase II	Al inicio Tras 6 horas al final	HPLC-MS/MS LOQ= 200	0	0
Miyake et al. (2013) [222]; Japón	4	Farmacéuticos	Ciclofosfamida	CSB II B2, CSDTD, guantes, bata, gorro, máscara quirúrgica	Orina 24 horas	GC-MS/MS LOD= 10	<b>1<sup>er</sup> período:</b> 76,5% (26/34)  <b>2<sup>o</sup> período:</b> 6,4% (2/31)	<b>1<sup>er</sup> período:</b> CP= 27-71,3 ng/24h  <b>2<sup>o</sup> período:</b> CP= 6,4-7,8 ng/24h
Rosales-Rimache (2013) [223]; Perú	96	Preparación y administración	Ciclofosfamida	-	Orina 24 horas	GC-MS	70,8% (68/96)	Promedio: 16,2-1163,9 ng/24h

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Yoshida et al. (2013) [224]; Japón	-	Farmacéuticos (monitorización varios años)	Ciclofosfamida, FBAL	CSB clase II, guantes, CSDTD	24 horas desde inicio	GC-HRMS LOD CP= 3 LOD FBAL= 16	<b>1<sup>er</sup> período:</b> CP= 45% (5/11) FBAL= 55% (6/11) <b>2<sup>o</sup> período:</b> FBAL= 17% (1/6)	<b>1<sup>er</sup> período:</b> CP máx= 40 ng/24h FBAL máx= 270 ng/24h <b>2<sup>o</sup> período:</b> FBAL máx= 30 ng/24h
Ramphal et al. (2014) [225]; Canadá	41 + 39 +10	Enfermeros oncológicos + Controles no oncológicos + Controles	Ciclofosfamida	EPIs	24 horas desde mitad de turno	GC-MS LOD= 10	34,1% (14/41 oncológ.) 33,3% (13/39 no oncológ.)	CP oncológ.= 12-474 ng/24h CP no oncológ.= 18-286 ng/24h
Hon et al. (2015) [226]; Canadá	103	Preparación, Administración, Recepción, Otros (6 hospitales)	Ciclofosfamida	-	24 horas (pool)	HPLC-MS/MS LOD= 50	55% (111/201)	CP media= 156 CP máx.= 2370
Moretti et al. (2015) [77]; Italia	71 + 77	Enfermeros + Controles	Ciclofosfamida	-	Al final	LC-MS/MS LOD= 40	2,8% (2/71 trabajadores)	CP= 80-120
Ramphal et al. (2015) [227]; Ontario	7 + 5	Personal de farmacia oncológica + Controles (farmacéuticos/ técnicos)	Ciclofosfamida	CSB clase II B2 (extracción total) No antesala Bata, guantes, máscara	24 horas desde mitad de turno (análisis fraccionado)	GC-MS LOD= 10	-	Expuestos: 6-66,5 ng/24h  Controles: 30-108,3 ng/24h

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Sessink et al. (2015) [228]; Países Bajos	2	Técnicos farmacia	Ciclofosfamida	CSB, robot, guantes, bata, gorro, calzas, máscara	Orina 24 horas	LOD= 10	0%	-
Fabrizi et al. (2016) [229]; Italia	9	Enfermeros, asistentes, farmacéutico, recepcionista	CP, IF, Citarab, Doca, Doxo, Epi, ETP, 5-FU, Gem, MTX, Pacli, Doce, VBT, VCN	-	Al final	UPLC-MS/MS LOD= 30-33330	33% (3/9 trabajadores)	MTX= 220 Pacli y ETP <LOQ
Poupeau et al. (2016) [230]; Francia	101	Farmacéuticos, Técnicos, Enfermeros, Médicos	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metotrexato, 5-Fluorouracilo (FBAL)	CSB clase II A2/B2, EPis, no CSDTD	Al final	UPLC-MS/MS LOD: CP= 9; IF= 9,7; MTX= 75; FBAL= 120	0%	-
Raffin et al. (2016) [231]; Francia	116	Técnicos, Enfermeros, Otros (celadores, limpiadores, asistentes, cuidadores) (11 hospitales)	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metotrexato	-	Al inicio Al final	LC-MS/MS LOD= 10	Total= 4,4% (28/635) CP= 3,6% (23/635) IF= 0,6% (2/357) MTX= 0,8% (3/357) 9,5% (11/116 trabajadores)	CP= 20,1-1850 IF= 25-37 MTX= 26,6-57,1
Baniasadi et al. (2018) [94]; Irán	15 + 15	Enfermeros, Asistentes, Limpieza, Secretario + Control	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Guantes, máscara	Al inicio Al final	GC-MS LLOQ CP= 40 LLOQ IF= 50	-	CP= 110-1040 IF= 120-350

Referencia	Nº trabajadores (expuestos + controles)	Puesto de trabajo	Compuestos	Protección	Tipo de muestra	Instrumentación - LOD (pg/mL)	% positivos	Rango Concentración (pg/mL)
Dugheri et al. (2018b) [232]; Italia	398 Evaluación 2009-2017	Farmacéuticos, Técnicos, Enfermeros	Ciclofosfamida, Ifosfamida, 5-Fluorouracilo, Platino	CSB clase II tipo A2, CSDTD, guantes	24 horas (análisis fraccionado)	LC-MS/MS ICP-MS LOD= 7700-234000	0% (0/398)	-
Izzo et al. (2018) [233]; Italia	15	Trabajadores expuestos	CP, IF, MTX, BMA, Iri, Doxo, Dauno, Pacli	-	24 horas al finalizar turno el Viernes	UHPLC-MS/MS LOD= 2,5-5	13,3% (2/15 trabajadores)	Iri= 35
Koller et al. (2018) [234]; Alemania	15	Enfermeros, Médico	Ciclofosfamida, 5-Fluorouracilo, Platino	Guantes	Al inicio Al final (N= 98)	CP, 5-FU --> GC-MS/MS Pt --> voltimetría LOD CP= 50 LOD FBAL= 200 LOD Pt= 1	2% (2/98)	Pt= 10,3-16,2
Chauchat et al. (2019) [235]; Canadá	56	Farmaceuticos, Técnicos, Enfermeros (2 hospitales)	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Metotrexato, FBAL	Guantes, otros	Al final	UPLC-MS/MS LOD= 9; 9,7; 75; 120	0%	-

5-FU= 5-fluorouracilo, BMA= bendamustina, Carbo-Pt= carboplatino, Cis-Pt= cisplatino, Citarab= citarabina, CP= ciclofosfamida, Dac= dacarbazina, Dauno= daunorubicina, Doce= docetaxel, Doxo= doxorubicina, Epi= epirubicina, ETP=etopósido, FBAL=  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina, Gem= gemcitabina, Ida= idarubicina, IF= ifosfamida, Inmuno= inmunoensayo, Iri= irinotecán, máx.= máximo, MTX= metotrexato, oncológ.= oncológicos, Pacli= paclitaxel, Pt= platino, VBT= vinblastina, VCN= vincristina.

### 1.5.5.1.2. Marcadores de exposición ambiental

Distintos tipos de superficies y objetos han sido muestreados con el propósito de determinar la contaminación del entorno de trabajo, así como también la eficacia de las medidas de prevención utilizadas. Las diferentes superficies de trabajo como suelos, cabinas de seguridad biológica (CSB), bandejas, encimeras, mesas, carros y estanterías, entre otras, son zonas habitualmente monitorizadas con el fin de determinar si existe riesgo de exposición [72; 178; 180; 213; 217; 218; 220; 236-253]. Otras superficies que también han sido estudiadas son las bombas de perfusión, las bolsas de administración intravenosa, los sillones de administración [203; 210; 234; 254-258], los viales y su embalaje [78; 193; 215; 259-265], o los baños de pacientes [75; 120; 177; 212; 221; 232; 266]. Destaca también el muestreo de los guantes, tanto por su cara externa como interna [110; 201; 205; 207; 267; 268], y las muestras tomadas mediante tejidos colocados directamente sobre la superficie corporal o por la parte externa y/o interna de los EPIs [77; 198; 269-273]. Las muestras de aire recogidas mediante una bomba de succión a través de un filtro en el cual quedan retenidas las partículas en suspensión [74; 80; 192; 205; 219; 267; 274] dan una idea de la contaminación presente en el ambiente y, por tanto, constituyen un dato objetivo sobre la exposición y posible riesgo debido a un uso incorrecto de los EPIs, el empleo de prácticas incorrectas, el mal funcionamiento de las CSB, y por la posible expansión a otras zonas en las que no sean necesarias las medidas de protección, con la consiguiente exposición y riesgo por parte del personal no implicado directamente en el manejo de fármacos citostáticos. El compuesto evaluado con mayor frecuencia ha sido ciclofosfamida, seguido por metotrexato, gemcitabina, doxorubicina, paclitaxel y etopósido. La mayoría de publicaciones incluyen la monitorización de 1-3 compuestos y solo unos pocos evalúan 20 o más citostáticos diferentes. La instrumentación analítica utilizada, al igual que en la determinación en muestras de orina, ha sido muy variada, desde técnicas de cromatografía de gases o de líquidos acopladas con espectrómetros de masas simples o dobles, detectores de captura electrónica, ultravioleta o array de diodos, hasta técnicas de inmunoensayo. Asimismo, los límites de detección también varían considerablemente desde los 0,05 pg/cm<sup>2</sup> para ciclofosfamida hasta los 200 pg/cm<sup>2</sup> para doxorubicina. De este modo, el porcentaje de muestras positivas osciló entre el 0,6% y el 100%, con unos valores comprendidos entre 1,8 pg/cm<sup>2</sup> y 3,834 µg/cm<sup>2</sup>, en función del compuesto evaluado. La **Tabla 2**

recoge algunas características de los estudios en los que se evaluó la exposición a fármacos citostáticos en distintas superficies de trabajo, tales como las zonas investigadas, las superficies muestreadas, el área evaluada, los compuestos monitorizados, las técnicas instrumentales utilizadas y los límites de detección alcanzados, el porcentaje de muestras positivas y los valores obtenidos.



**Tabla 2:** Estudios en los que se evalúa la exposición a fármacos citostáticos en superficies de trabajo, guantes, viales y parches dérmicos.

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Sessink et al. (1991) [192]; Países Bajos	Preparación	CSB, suelos	Variable: 100-8500 cm <sup>2</sup>	CP, MTX, 5-FU	CP -> GC-MS MTX, 5-FU -> HPLC-UV	-	CP= 140-160000 MTX= 2.000-633000 5-FU= 10000-236000
		Guantes	-	CP, MTX, 5-FU		-	CP= 17-20 µg MTX= 19-156 µg 5-FU= 5-980 µg
Sessink et al. (1992) [193]; Países Bajos	Preparación, administración e ingresados	CSB, suelos, mesas	Variable: 0,4- 1,52 m <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, 5-FU	CP, IF -> GC-MS MTX, 5-FU -> HPLC-UV LOD= 10-1000	-	CP= 100-450000 5-FU= 200-10700 MTX= 5500-5900
		Viales	-	CP, IF, MTX, 5-FU	LOD= 60-3000 ng	-	CP= 60 ng MTX= 15000 ng 5-FU= 1400-6200 ng
		Guantes	-	CP, IF, MTX, 5-FU	LOD= 0,1-6 µg/guante	-	CP= 11-21 µg MTX= 31-49 µg 5-FU= 2-140 µg
Sessink et al. (1994) [80]; Países Bajos	Preparación	Guantes	-	CP, MTX, 5-FU	Ver [198]	-	CP= 0.5-73 µg/par MTX= 63-1900 µg/par 5-FU= 21-760 µg/par
Minoia et al. (1998) [198]; Italia	Preparación y administración	CSB, suelos, manillas (2 hospitales)	225 cm <sup>2</sup>	CP, IF	HPLC-MS/MS LOD= 10	-	CP= 20-3834000 IF= 20-1416000
		Personal <i>pads</i>	-	CP, IF	LOD= 10	-	CP= 40-1139800 IF= 200-2987000
		Guantes (parte interna)	-	CP, IF	LOD= 20 ng/par	-	CP= 633-63400 ng/par
Connor et al. (1999) [275]; Canadá, EE.UU.	Preparación y administración	CSB, encimeras, suelos, mesas, carros, sillones (6 hospitales)	4900 cm <sup>2</sup>	CP, IF, 5-FU	CP, IF -> GC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV LOD= 0,1-20 ng/mL (2-400 ng/muestra)	Preparación= 75% Administración= 65%	CP= 10-65660 IF= 10-459000 5-FU= 700-208590

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Connor et al. (2002) [276]; EE.UU.	Preparación	CSB, suelos, mesas, carros, encimeras ...	-	CP, IF, 5-FU	CP, IF -> GC-MS/MS 5-FU -> HPLC LOD= 0,1-20 ng/mL (2-400 ng/muestra)	-	<b>Antes medidas:</b> CP= 10-1830 IF= 10-11400 5-FU= 10-4780 <b>Tras medidas:</b> CP= 70-32000 IF= 20-108000 5-FU= 270-34200
Nygren et al. (2002) [277]; Suecia	-	Viales	-	Platino	Voltametría	100% (6/6)	Pt= 0,2-99 ng
Schmaus et al. (2002) [278]; Alemania (2000)	Preparación	CSB, suelos, encimeras, estanterías, contenedores... (14 hospitales)	400 cm <sup>2</sup>	CP, IF, 5-FU, Pt	GC-MS Pt -> Voltametría LOD= 0,01-2,5	CP= 22.7% (42/185) IF= 15.1% (28/185) 5-FU= 67.6% (25/37) Pt= 100% (147/147)	CP= 6-5106 IF= 8-1860 5-FU= 3-1378 Pt= 1-2700
Ziegler et al. (2002) [201]; Reino Unido	Preparación	Mesa, manilla, puerta nevera	0,25 m <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, Pt	CP, IF -> GC-MS MTX -> Inmunoensayo Pt -> ICP-MS	-	CP= 124.8 IF= 2-52.4 MTX= 4,4-7,6 Pt= 103,6
	Administración	Guantes	-	CP, IF, MTX, Pt	LOD= 0,24-18 ng	-	CP= <LOD-11,2 ng IF= <LOD-1806 ng MTX= <LOD-49,3 ng Pt= 0,4-36 ng
Favier et al. (2003) [259]; Francia	-	Viales y embalaje	-	CP, IF, ETP, Doxo, Doce, 5-FU	CP, IF -> GC ETP, Doce, 5-FU, Pacli -> HPLC LOD= 4-140 ng/mL	-	Rango [ ] media: CP= 2,9-11,9 ng IF= 10,7-13,1 ng ETP= 117-740 ng Doxo= 0,5-29 ng Doce= 366 ng 5-FU= 100-2447 ng

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Mason et al. (2003) [260]; Reino Unido	Almacenamiento	Suelo estanterías (3 hospitales)	500 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, Cisplatino, Carboplatino	CP, IF -> GC-MS MTX -> Inmunoensayo Pt -> ICP-MS	-	CP= 57,4-104,8 MTX= 1,8-4,1 Pt= 392,8-634,8
	-	Viales	-	CP, IF, MTX, Cisplatino, Carboplatino	LOD= 1-5 ng/vial	CP= 10% (3/30) MTX= 40% (12/30) Cis-Pt= 13% (4/30) Carbo-Pt= 100% IF= 3,3% (1/30)	CP= <LOD-39 ng IF= <LOD-344 ng MTX= <LOD-18 ng Cis-Pt= <LOD-9 ng Carbo-Pt= 7-251 ng
	-	Guantes	-	CP, IF, MTX, Cisplatino, Carboplatino	-	-	CP= 1632 ng/par MTX= 13 ng/par Pt= 28-38 ng/par
Wick et al. (2003) [203]; EE.UU. (2001-2002)	Preparación y administración	CSB, antesala, contenedor, sillón, suelo, manilla, bolsa I.V.	Variable: Máx 0,5 m <sup>2</sup>	CP, IF	HPLC-MS/MS LOQ= 0,1 ng/mL	CP= 63,2% (24/38) IF= 68,4% (26/38)	CP= 0,4- >330 IF= 0,7-737
Fransman et al. (2004) [269]; Países Bajos	Preparación y limpieza y cuidado de pacientes	CSB, orinal, ropa de cama, toallas... (3 hospitales)	Variable: 100-1700 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS LOD= 100 pg/mL		CP= 9-18000
		Personal pads/Dérmica	15 y 100 cm <sup>2</sup>				Resultados Positivos
		Guantes/Manos	-				CP= 0,02-1,19 ng/cm <sup>2</sup> /min
		Ropa de cama/ toallas	560 – 28800 cm <sup>2</sup>				CP= 690-42700
Hedmer et al. (2004) [274]; Suecia	Preparación	CSB	100 o 400 cm <sup>2</sup>	CP	LC-MS/MS LOD= 0,05	-	CP= 3,3-3,5
Acampora et al. (2005) [236]; Italia	Preparación	CSB, suelos, manillas, carros... (2 hospitales)	225 cm <sup>2</sup>	CP, IF	GC-MS LOD= 6-30	CP= 81% IF= 16%	CP= 200-100000

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Barbieri et al. (2005) [204]; Italia	Preparación	CSB, suelo, pomos, grifos	100 o 500 cm <sup>2</sup>	CP, MTX, 5-FU	μ-HPLC-MS/MS LOD CP, MTX= 100 LOD 5-FU= 3300	-	CP= 500-1084100 MTX= 500-2514800 5-FU= 7600-1251100
Cavallo et al. (2005) [120]; Italia	Preparación y administración	CSB, mesas, cajones, suelos, bombas, sillón, basura, baños	-	CP, IF, 5-FU, Gem, Citarab	HPLC-UV CP, IF -> GC-ECD LOD= 10-500	-	Resultados Positivos
Connor et al. (2005) [78]; EE.UU	Estudio 1	Viales	-	CP, IF	HPLC-MS/MS LOD= 1-11 ng/vial	CP= 100% (48/48) IF= 25% (9/36)	CP= 88-69819 ng/vial IF= 1478-1705 ng/vial
	Estudio 2	Viales	-	CP, 5-FU	CP -> GC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV LOD= 16-3200 ng/vial	CP= 88,9% (48/54) 5-FU= 7,4% (4/54)	CP= 19-8782 ng/vial 5-FU= 7680-630560 ng/vial
	Estudio 3	Viales	-	Cisplatino	LOD= 2 pg/mL	-	Cis-Pt= 2-256 ng o 20-3590 pg/cm <sup>2</sup>
Crauste-Manciet et al. (2005) [258]; Francia	Preparación	CSB, mesas, suelo... (2 hospitales)	Variable: 625 – 6400 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, 5-FU	CP, IF -> HPLC-MS/MS MTX, 5-FU -> HPLC-UV LOD= 100-20000	-	CP= 30-6550 MTX= 1810-8610 5-FU= 9730-83760 IF= 30-850
		Guantes	-	CP, IF, MTX, 5-FU			CP= 301-9214 ng MTX= 1632 ng 5-FU= 2770-359440 ng IF= 170-930 ng
		Viales/bolsa I.V.	-	CP, 5-FU			CP= 70-910 5-FU= 100920
Hedmer et al. (2005) [261]; Suecia	Preparación	CSB, suelos, otras superficies de trabajo	400 cm <sup>2</sup>	CP, IF	LC-MS/MS LOD CP= 0,05 LOD IF= 0,1	-	CP= 2,2-2333,3 IF= 1,2-740
	-	Embalajes	130, 200 y 240 cm <sup>2</sup>	CP, IF	LC-MS/MS	CP= 50-100% IF= 0-100%	CP= 0,1-190 ng IF= 0,2-59 ng

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Mason et al. (2005) [205]; Reino Unido	Preparación	Suelos (2 hospitales)	0,5 m <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, Pt	CP, IF -> GC-MS MTX -> Inmunoensayo Pt= ICP-MS LOD (CP, IF, MTX)= 1 LOD Pt= 0,02	-	CP= 2,2-159,6 IF= 3,1-150,3 MTX= 2-67,4 Pt= 0,5-13
	-	Guantes	-	CP, IF, MTX, Pt	LOD= 0,1-5 ng	-	CP= 100-5993 ng IF= 99-1159 ng MTX= 11-890 ng Pt= 3-102
Fransman et al. (2005) [272]; Países Bajos	Preparación y limpieza y cuidado de pacientes	CSB, orinal, bolsas infusión, baños... (4 hospitales)	Variable: 100 – 1700 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS LOD= 100 pg/mL	20-100%	CP= 8-3299 ng
		Personal <i>pads</i>	-			4-16%	CP= 8-3780,8 ng
		Guantes/Manos	-			0-38%	CP= 12,5-2133,2 ng
		Ropa de cama/ toallas	-			60-100%	CP= 8-43991 ng
Sabatini et al. (2005) [237]; Italia	Preparación y administración	CSB, suelo, manilla, grifo	Variable: 100- 500 cm <sup>2</sup>	CP, MTX, 5-FU	HPLC-MS/MS LOD= 10-330	100% (28/28)	CP= 30-108410 MTX= 50-251480 5-FU= 760-125110
Meijster et al. (2006) [73]; Países Bajos	Residencias, lavanderías, veterinaria, atención domiciliaria	Guantes, lavado de manos, ropa, agua lavado paciente	-	CP, 5-FU, Carboplatino	CP -> GC-MS 5-FU -> HPLC Pt -> Voltametría	-	Resultados positivos
Ursini et al. (2006) [132]; Italia			-	Gem, CP, IF, 5-FU, Citarab	HPLC-UV CP, IF -> GC-ECD LOD= 10-500	-	Resultados Positivos CP, IF, 5-FU Total= 2200
Fransman et al. (2007a) [207]; Países Bajos (1997-2002)	Administración y cuidado de pacientes	-	Variable	CP	GC-MS/MS LOD= 100 pg/mL	CP 1997= 78,2% (111/142) CP 2000= 46,1% (53/115)	CP 1997= 60-29500 CP 2000= 100-2230

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
		Guantes	-			CP 1997=78,9% (15/19) CP 2002= 37,1% (23/62)	CP 1997= 113,3-207434 ng/par CP 2002= 20,7-97754 ng/par
Fransman et al. (2007b) [267]; Países Bajos	Lavandería industrial	Ropa de cama de pacientes	100 cm <sup>2</sup>	Gem, CP, MTX, ETP, IF, 5-FU, Citarab, Cloramb	HPLC-MS/MS IDL= 0,25-5 ng/mL	26,7% (4/15) CP= 20% (3/15) IF= 13,3% (2/15) 5-FU= 6.7% (1/15)	CP= 154-30600 IF= 130-400 5-FU= 322
		Guantes	-		LOD= 20-100 ng/muestra	0%	-
		Lavado manos	-		LOD= 0,5-5 ng/mL	0%	-
Fransman et al. (2007c) [110]; Países Bajos (1996-1997)	Preparación, administración, cuidado pacientes, limpieza	Guantes (6 hospitales)	-	CP	GC-MS/MS	-	CP= 0,01-207,4 µg/tarea
Ikeda et al. (2007) [208]; Japón	Preparación	CSB, hoja CSB, suelo, viales, teléfono, bandeja, papelera, guantes, máscaras...	100 cm <sup>2</sup>	IF	HPLC-fluorescencia	-	Positivo
Nyman et al. (2007) [209]; EE.UU.	Farmacia, enfermería y habitación pacientes	-	Variable: Máx= 0,511 m <sup>2</sup>	CP, IF	HPLC-MS/MS LOQ= 0,1 ng/mL	21% (7/34)	CP= 0,3-29 IF= 0,3-11
Castiglia et al. (2008) [279]; Italia	Preparación	CSB, suelos, pomos, fregadero, estanterías, interfono, bandejas	-	CP, IF, 5-FU	CP, IF -> GC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV LOD CP= 120 LOD IF= 600 LOD 5-FU= 4400	-	Conc. P <sub>50</sub> : CP= 860 IF= 1000 5-FU= 23630
Hedmer et al. (2008) [210]; Suecia	Preparación y administración	Suelos, manillas, báscula, bomba, superficies de trabajo...	400 cm <sup>2</sup>	CP, IF	LC-MS/MS LOD= 0,05 pg/cm <sup>2</sup>	0-100%	CP= 0,04-6300 IF= 0,3-95000

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Schierl et al. (2009) [238]; Alemania	Preparación y almacenamiento	CSB, mesas, suelos, estanterías... (102 farmacias)	400 cm <sup>2</sup> u objeto	5-FU, Platino	5-FU -> GC-MS Pt -> Voltametría LOD 5-FU= 0,75 LOD Pt= 0,025	5-FU= 74,4% (920/1237) Pt= 98,8%	5-FU= 0,85-253333 Pt= 0,03-23068
Siderov et al. (2009) [239]; Australia	Preparación	CSB, suelos, filtro HEPA, mesas... (10 hospitales)	4900 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS LOD= 100 pg/mL	67-100%	CP= 10-11710
Touzin et al. (2009) [240]; Canadá (2007)	Preparación	CSB, suelo, mostrador...	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD (CP, IF)= 0,76 LOD MTX= 7,5	CP= 54,1% (72/133) IF= 76,7% (102/133) MTX= 4,5% (6/133)	CP= 4-3500 IF= 2-5700 MTX= 2-1800
Alcântara et al. (2010) [262], Brasil	Laboratorio de investigación	Guantes	-	MTX, Pacli, 5-FU	HPLC-DAD LOD= 0,1-0,2 µg/mL	Total= 100% (6/6) MTX= 50% Pacli= 50% 5-FU= 100%	MTX= 3-4,8 µg/mL Pacli= 0,3-0,8 µg/mL 5-FU= 0,4-0,7 µg/mL
		Viales/Ampollas	-	MTX, 5-FU	LOD= 0,3-3 µg/mL	-	-
Connor et al (2010) [212]; EE.UU	Farmacia enfermería y área pacientes	CSB, suelos, mostradores, mesas, carros, bandejas, baños... (3 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, 5-FU, Pacli, Citarab	HPLC-MS/MS LOD (CP, IF)= 100 LOD 5-FU= 60 LOD Pacli= 70 LOD cita= 130	Total= 60% CP= 43% (61/143) 5-FU= 26% (37/143) IF= 24% (34/143) Pacli= 16% (23/143) Citarab= 3% (5/143)	Rango Conc. media (máx) CP= 10-18100 (143000) 5-FU= 10-182000 (910000) IF= 10-4000 Pacli= 10-150 Citarab= 200-4600
Maeda et al. (2010) [213]; Japón	Preparación	CSB, mesas	800 cm <sup>2</sup>	CP, IF	LC-MS/MS LOD= 2,5	-	CP= 10-2336,3
Schierl et al (2010) [263]; Alemania	- (Monitorización 2000-2008)	Viales	-	CP, IF, 5-FU, Platino	GC-MS Pt -> Voltametría LOD= 0,05-3 ng/vial	-	CP= 9-912 ng/vial 5-FU= 0,6-891 ng/vial IF= 33-713 ng/vial Pt= 0,1-3705 ng/vial

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Sottani et al. (2010) [178]; Italia	Preparación y otras zonas (Monitorización 10 años 1998-2007)	CSB, bandejas, mesa, suelo, manillas (5 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Doxo, Epi, Dauno	HPLC-MS/MS LOD= 60 LLOQ= 125	Variable (0-100%) según año, zona y hospital	CP= 13-690004
Hon et al. (2011a) [273]; Canadá (2006)	Preparación	Dérmicas (Manos) (6 hospitales)	-	CP, MTX	UPLC-MS/MS LOD= 90-2500 pg/muestra LOD varía según lote	27,8% (5/18)	CP= 2700-3960 pg/muestra MTX= 110-270 pg/muestra
Hon et al. (2011b) [242]; Canadá	Preparación y administración	CSB, carro, grifo, encimera, bomba, manilla, bandeja, contenedor, interruptor... (6 hospitales)	-	CP	-	34,5% (95/275)	CP= 0,38-988,47 ng/muestra
Osawa et al. (2011) [280]; Japón	-	Viales	-	Cisplatino Carboplatino	LC-MS/MS LLOQ= 30 pg	-	Cis-Pt= 177-17000 pg Carbo-Pt= 480-794000 pg
Sessink et al. (2011) [281]; EE.UU.	Preparación (22 hospitales) (2000-2005)	CSB, suelo, encimeras	Variable: 300-11050 cm <sup>2</sup>	CP, IF, 5-FU	CP, IF -> GC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV LOD= 0,1-20 ng/mL	<b>Antes CSDTD:</b> CP= 78%; IF= 54%; 5-FU= 33% <b>Tras CSDTD:</b> CP= 68%; IF= 45%; 5-FU= 20%	<b>Antes CSDTD:</b> CP= 10-158000 IF= 10-24280 5-FU= 1100-228700 <b>Tras CSDTD:</b> CP= 10-17150 IF= 10-8860 5-FU= 600-186800
Sugiura et al. (2011) [217]; Japón	Preparación y administración	CSB, suelos, sillones, mesas, bandejas, mostradores... (6 hospitales)	Variable: 400-5104 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS LOD= 100 pg/mL	48,6% (35/72)	CP= 10-26190

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Sugiura et al. (2011) [218]; Japón (2006)	Preparación y administración	Mesas, suelos, mostradores	Variable: 1443-4200 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS LOD= 100 pg/mL	93,8% (15/16)	CP= 10-7180
Turci et al. (2011) [219]; Italia	Preparación, almacenamiento, administración Monitorización 5 años (2003-2007)	BSC, suelos, manillas (7 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, 5-FU, Platino	CP -> HPLC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV Pt -> ICP-MS LOQ CP= 125 LOQ 5-FU= 1000	Variable (0-100%) según año, zona y hospital	CP= 100-159800 5-FU= 1000-1560000 Pt= 10-5050
		Personal <i>pads</i>	-			Variable	5-FU= 100-7950 ng CP= 10-340 ng Pt= 1-450 ng
		Guantes	-			-	Pt= 1,2-3 ng
Villarini et al. (2011) [133]; Italia	Área preparación y oncología	Zonas de trabajo, suelos, cajas, manillas, bolsas infusión...	100 o 400 cm <sup>2</sup>	5-FU, Citarabina	HPLC-UV LOD= 10 ng/mL	29,3% (22/75)	Total = 200-20000
		Personal <i>pads</i>	-	5-FU, Citarabina	LOD= 10 ng/ <i>pad</i>	5-FU= 13% (6/46) Citarab= 16,7% (2/12)	Rango Conc. máx: 5-FU= 40-8690 ng/ <i>pad</i> Citarab= 60-150 ng/ <i>pad</i>
Yoshida et al. (2011) [220]; Japón (2008-2009)	Preparación	CSB, bandejas, mesas, suelos (5 hospitales)	-	Gem, CP, 5-FU, Platino	CP -> GC-MS Gem, 5-FU -> HPLC-UV Pt -> ICP-MS LOD CP= 6 ng LOD (Gem, 5-FU)= 1000 ng LOD Pt= 10 ng	-	Rango Conc. media: CP= 2-850 Gem= 200-13000 5-FU= 73-43000 Pt= 1-320
Zock et al. (2011) [282]; EE.UU	Preparación	CSB, suelo debajo CSB	Variable: 2000-4400 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS LOD= 15,7 ng/muestra	-	CP= 110-140
	-	Viales	-	CP	-	-	CP= 17-2694 ng/5 viales
	-	Guantes	-	CP	-	-	CP= 377 ng/par

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Chu et al. (2012) [241]; Canadá	Preparación	CSB, bandejas, manillas... (6 hospitales)	50 cm <sup>2</sup> u objeto	CP, MTX	LC-MS/MS LOD= 9,5-25	30,4% (14/46) CP= 30,4% MTX= 15,2%	CP= 30-8530 MTX= 10-12450
Hama et al. (2012) [215]; Japón	-	Viales	115 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS o LC-MS/MS LOD= 10-16 ng	30-60%	CP= 40-540
Álvarez et al. (2012) [283]; España	Preparación y administración (T=0 y T=3 h)	CSB, mesa antesala, mesa administración	Variable: 0,3-2,7 m <sup>2</sup>	CP, Gem, 5-FU	HPLC-UV LOD CP= 15 ng/mL LOD Gem= 29 ng/mL LOD 5-FU= 103 ng/mL	CP= 20-60% Gem= 20-100% 5-FU= 40-92,3%	*Conc. (P <sub>50</sub> ; P <sub>90</sub> ): CP= 67; 775 Gem= 3; 14988 5-FU= 130; 7406
Bussières et al. (2012) [253]; Canadá (2008-2010)	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (25 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD CP= 1,5 LOD IF= 1,2 LOD MTX= 6	CP= 52% IF= 20% MTX= 3%	*Conc. (P <sub>50</sub> ; máx): CP= 2; 28000 IF= <LOD; 8600 MTX= <LOD; 580
Hedmer et al. (2012) [284]; Suecia	Administración	Suelos, sillones, manillas, cajas, estantes, paneles de control, baños, balanzas... (5 hospitales)	400 cm <sup>2</sup> u objeto	CP, IF	LC-MS/MS LOD CP= 0,05 LOD IF= 0,125	CP= 80% (358/447) IF= 73% (326/447)	CP= 0,1-10800 IF= 0,2-95000
Nussbaumer et al. (2012) [285]; Suíza	Preparación	Aislador, suelos, teléfono, cajas fármacos	100 cm <sup>2</sup>	Gem, MTX, ETP, CP, IF, Iri, Doxo, Epi, VCN, Citarab	LC-MS/MS	-	Gem= 240- >2000 ETP= 100-620 CP= 240-980 Iri= 280-940
Sottani et al. (2012) [221]; Italia	Farmacia y área de pacientes	CSB, encimeras, contenedores, suelos, bandejas, mesas, baños (4 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem	LC-MS/MS LLOQ (CP, IF)= 125 LOQ Gem= 250	54%	Rango Conc. media: CP= 97-17418 IF= 64-7274 Gem= 41-385
	-	Personal <i>pads</i>	-	CP, IF, Gem		26%	Rango Conc. media: CP= 286-26986 IF= 50-8238 Gem= 47-8875

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
		Bolsa I.V.	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem		-	CP= 1441 Gem= 132,5
Yuki et al. (2012) [286]; Japón	Casa pacientes	Asiento y tapa baño, pulsador, pomo puerta, suelo, soporte papel baño, barandilla, grifo	Variable: 30 - 4000 cm <sup>2</sup>	CP, 5-FU	CP -> GC-MS/MS 5-FU -> HPLC-UV LOD CP= 0,1 ng/mL LOD 5-FU= 20 pg/mL	47,1% (8/17)	CP= 30-7340
Bobin-Dubigeon et al. (2013) [254], Francia	Preparación y administración	Bombas, manillas, bandejas...	100 cm <sup>2</sup>	CP, Doxo, 5-FU	HPLC-MS/MS LOD (5-FU, Doxo)= 50 LOD CP= 5	CP= 26,9% (7/26) Doxo= 11,5% (3/26) 5-FU= 7,7% (2/26)	CP= 36-1340 Doxo= 120-198 5-FU= 188-599
	-	Viales	100 cm <sup>2</sup>	CP	-	-	CP= 0,8-166,4 ng/vial
Couch et al (2013) [74]; EE.UU.	Recepción, preparación y administración	BSC, mesas, contenedores, suelos, (hospital veterinario)	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Doxo	LOD CP= 50 LOD IF= 20 LOD Doxo= 70	9,1% (4/44)	CP= 50-2400 IF= 290-370
Hon et al. (2013) [255]; Canadá (2010-2011)	Recepción, preparación, transporte, administración y residuos	CSB, mostrador, papeleras, bandejas, lápiz, mesas, manilla, ordenador, estantes, bomba... (6 hospitales)	100 cm <sup>2</sup> u objeto	CP	HPLC-MS/MS LOD= 356 pg/muestra	36,3% (159/438)	Rango Conc. máx: CP= 6-26200 pg/muestra

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Kiffmeyer et al. (2013) [72]; Alemania	Preparación	Suelo CSB, mesa, nevera y manilla (55 +75 farmacias)	900 cm <sup>2</sup>	Gem, MTX, CP, ETP, Doce, Pacli, IF, 5-FU	HPLC-MS/MS  LOQ (CP, IF, ETP, MTX)= 3,7 LOQ Gem= 7,3 LOQ 5-FU= 11 LOQ Pacli= 18 LOQ Doce= 37	61% (774/1269) CP= 36,9% (468/1269) 5-FU= 31,2% (396/1269) Gem= 31,7% (402/1269) IF= 21,3% (270/1269) ETP= 5,3% (67/1269) MTX= 3,3% (42/1269) Doce= 1,2% (15/1269) Pacli= 0,6% (7/1269)	Conc. máx: Gem= 1888000 IF= 89000 5-FU= 24000 MTX= 35000
Kopp et al. (2013a) [266]; Alemania (2010)	Recepción, preparación y administración	CSB, suelos, bombas, mostradores sillones, baños, contenedores... (28 hospitales)	900 cm <sup>2</sup> u objeto	Gem, CP, IF, MTX, Doce, Pacli, 5-FU, Platino	LC-MS/MS 5-FU -> GC-MS Pt -> Voltametría  LOD Pt= 0,022 LOD (resto)= 0,22	Total= 60,9% (465/763) % 5-FU= 93,5% % Pt= 88,4% Gem= 64,4% CP= 54,8% Pacli= 47,9% Doce= 32,9% IF= 26% MTX= 6,8%	*Conc. (P <sub>50</sub> ; máx): 5-FU= 8,1; 14556 Pt= 1,6; 714 Gem= 1,2; 750000 CP= 0,4; 2017 IF= <LOD; 43 *Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): MTX= <LOD; 535 Doce= 0,8; 189 Pacli= 3,1; 347
Kopp et al. (2013b) [243]; Francia	Recepción, preparación y eliminación	Aislador, suelo, mostradores, mesas, basura, teléfono, estanterías (2 hospitales)	400 cm <sup>2</sup>	Platino	Voltametría LOQ= 0,05	-	*Conc. (media; máx): Pt= 0,03; 198,4

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
		Guantes	-			18,2% (6/33)	*Conc. (media; máx): Pt= 30; 5860 pg/par
		Viales	-			Cis-Pt= 33% (6/18) Carbo-Pt= 33% (6/18) Oxali-Pt= 33% (5/15)	*Conc. (media; máx): Pt= 30; 190300 pg/3 viales
Maeda et al. (2013) [244]; Japón		CSB, mesas	800 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Iri, Doxo, Epi, Doce, Pacli, VDS, VCN, VBT	HPLC-MS/MS LOQ= 6,25-62,5	CP= 15,7% (11/70) Doxo= 7,1% (5/70) Doce= 4,3% (3/70) Pacli= 2,9% (2/70)	CP= 6,25-85 Doxo= 8,75-142,5 Doce= 11,25-435 Pacli= 17,5-23,75
Miyake et al. (2013) [222]; Japón (2007-2009)	Preparación	CSB, suelos, mesas	Variable: 1463-4900 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS LOD= 100 pg/mL	<b>Antes CSDTD:</b> CP= 66,7% (4/6) <b>Tras CSDTD:</b> CP= 16,7% (1/6)	<b>Antes CSDTD:</b> CP= 5-59 <b>Tras CSDTD:</b> CP= 8
Rosales-Rimache (2013) [223]; Perú (2011)	Preparación	CSB (9 hospitales)	-	CP	GC-MS LOD= 0,1 ng/mL	-	CP= 10-14980
Sessink et al. (2013) [287]; EE.UU.	Preparación	CSB, suelos, encimeras (30 hospitales) Monitorización 2004-2010	Variable	CP	GC-MS/MS LOD= 0,1 ng/mL	<b>Antes CSDTD:</b> CP= 83% <b>Tras CSDTD:</b> CP= 80%	<b>Antes CSDTD:</b> CP= 10-44170 <b>Tras CSDTD:</b> CP= 10-38590

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Yoshida et al. (2013) [224]; Japón	Preparación (Monitorización 2007-2011)	CSB, mesas, suelos	Variable: 1575-5850 cm <sup>2</sup>	CP, Gem, Pt, 5-FU	CP -> GC/MS Gem, 5-FU -> HPLC-UV PT -> ICP-MS LOD= 1-300 ng/muestra	<b>1<sup>er</sup> período:</b> CP= 83% Gem= 85% Pt= 79% 5-FU= 81% <b>2<sup>o</sup> período:</b> CP= 44% Gem= 11% Pt= 31% 5-FU= 17%	<b>1<sup>er</sup> período:</b> CP= <0,17-16000 Gem= <78-370000 Pt= <0,34-2400 5-FU= <78-98000 <b>2<sup>o</sup> período:</b> CP= <0,17-83 Gem= <36-3400 Pt= <0,34-42 5-FU= <0,52-7100
Fleury-Souverain et al. (2014) [288]; Suíza	-	Viales	-	CP, Doxo, Epi, ETP, Gem, Iri, MTX, IF, VCN, Citarab	LC-MS/MS LOQ= 500-2000 pg/mL	63% (84/133)  35% (47/133) contaminación cruzada	Gem= 0,56-24,44 ng Iri= 0,93-50,99 ng MTX= 0,25-52,28 ng ETP= 2,26-1890,6 ng CP= 0,79-0,83 ng Doxo= 2,62-4,05 ng Epi= 2,67-17,3 ng
Hon et al. (2014) [270]; Canadá (2010-2011)	Farmacéuticos, técnicos, enfermeros, transporte, recepción, otros	Dérmicas (Manos) (6 hospitales)	-	CP	HPLC-MS/MS LOD= 360 pg/muestra	19,6% (44/225)	*Conc. (media; máx): CP= 360; 22800 pg/muestra
Veigas et al. (2014) [245]; Portugal	Preparación y administración	CSB, bandejas, mostradores, manillas, mesas, bomba infusión, ordenador, estanterías, sillones, camas, carros, teléfonos... (2 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, Pacli, 5-FU	HPLC-DAD LOD CP= 100000 LOD Pacli= 167 LOD 5-FU= 3300	*37% (121/327) >LOQ *72,8% (238/327) >LOD  CP= 4,6% (15/327) 5-FU= 10,7% (35/327) Pacli= 21,7% (71/327)	CP= 300-21300 ng/cm <sup>2</sup> 5-FU= 10-78,8 ng/cm <sup>2</sup> Pacli= 0,7-1131,4 ng/cm <sup>2</sup>

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
		Guantes					Pacli= 14700-414700 5-FU= 11400
Merger et al. (2014) [249]; Canadá	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (33 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD CP= 1,8 LOD IF= 2,2 LOD MTX= 8	CP= 41,1% (137/333) IF= 19,5% (65/333) MTX= 5,1% (17/333)	*Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): CP= 2; 3600 IF= 3,5; 2600 MTX= 6,8; 2700
		Viales/Embalaje	-	CP, IF, MTX		CP= 33,3% (10/30) IF= 10% (3/30)	*Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): CP= 3; 14000 IF= 3,1; 130
Odraska et al. (2014) [246]; República Checa	Recepción y preparación (Monitorización 2008-2010)	Mesas de trabajo, suelos, manilla nevera (13 hospitales)	900 cm <sup>2</sup>	CP, Platino	CP -> HPLC-MS/MS Pt -> ICP-MS LOD CP= 2 LOD Pt= 0,2	68% (176/259) (1 compuesto) 46,3% (120/259) (ambos compuestos) CP= 50,2% (130/259) Pt= 64,5% (167/259)	*Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): CP= 5; 4420 Pt= 0,7; 7340
Ramphal et al. (2014) [225]; Canadá	Oncología e ingresados	Mostrador, suelo, escritorio	5000 cm <sup>2</sup>	CP	GC-MS/MS Ver [197; 198]	50% (3/6)	CP= 790-22170
Berruyer et al. (2015) [250]; Canadá	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (36 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD= 1,8-7,5	CP= 47,5% (184/387) IF= 18,3% (71/387) MTX= 2,3% (9/387)	*Conc. (media; máx): CP= 4,53; 2100 IF= 5,64; 3800 MTX= 14,5; 6100
		Viales/Embalaje	-	CP, IF, MTX		CP= 40% (14/35) IF= 11,4% (4/35) MTX= 5,7% (2/35)	*Conc. (media; máx): CP= 4,87; 33 IF= 10,2; 300 MTX= 22,9; 400
Ladeira et al. (2015) [131]; Portugal	-	- (2 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, Pacli, 5-FU	HPLC-DAD	37% (121/327)	Rango Conc. media: CP= 180000-1000000 Pacli= 12950-21380 5-FU= 13440-14740

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Moretti et al. (2015) [77]; Italia	Administración		-	CP	GC-MS/MS	100%	CP= 10-1400000
		Personal <i>pads</i>	-			100%	CP= 30-64000
Janes et al. (2015) [264]; Canadá	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (51 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD= 0,36-0,97	CP= 51,7% (278/538) IF= 22,3% (120/538) MTX= 9,7 (52/538)	*Conc. (P <sub>50</sub> ; máx): CP= 0,6; 11430 *Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): IF= 3,69; 85100 MTX= 1,46; 1080
		Viales/Embalaje	-	CP, IF, MTX		CP= 34,8% (16/46) IF= 10,9 (5/46) MTX= 4,3 (2/46)	*Conc. (P <sub>50</sub> ; máx): CP= 1,51; 8290 IF= 2,15; 233 MTX= 2,19; 249
Ramphal et al. (2015) [247]; Canadá	Farmacia preparación + Farmacia no oncológica	CSB, suelo, cajoneras, mostrador	0,5 m <sup>2</sup> o 0,6 m <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS o GC-MS/MS	-	CP= 8,3-200 IF= 3,5-9 MTX= 250-1400
Sessink et al. (2015) [228]; Bélgica (2012)	Preparación	Aislador, suelo, ordenador, estantería	-	CP	LOD= 100 pg/mL	46,2% (18/39)	CP= 10-330 Tras derrame intencionado CP= 72650
		Viales, bolsas I.V.	-	CP	LOD= 100 pg/mL	-	Viales= 197-4784 ng Bolsa I.V.= 22-1114 ng
		Guantes	-	CP	LOD= 100 pg/mL	-	CP= 25-1514 ng
Böhlandt et al. (2016) [289]; Alemania, Austria y Suíza	Preparación (Monitorización 2000-2015)	CSB, suelos, neveras, estanterías, encimeras, pomos, bandejas, ratón, teclado, teléfonos, contenedores ... (151 farmacias)	400 cm <sup>2</sup>	5-FU, Platino	5-FU -> GC-MS/MS Pt -> voltametría LOD 5-FU= 0,5 LOD Pt= 0,025 ( <i>cut-off</i> 0,1)	5-FU= 56% Pt= 82%	Conc. (P <sub>50</sub> ; máx): 5-FU= 0,5; 1725000 Pt= 0,2; 23068

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Dal Bello et al. (2016) [256]; Italia	Preparación y administración	CSB, suelos, carro, cajetín, sillón	2000 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem, MTX, Doxo, Carbo-Pt, 5-FU, citarab, Mitom C	HPLC-HR-MS/MS LLOQ= 0,5 o 1000 pg/mL	-	CP= 60,2-78,2 IF= 43,8-563 MTX= 108 5-FU= 300-716
Enciso-Zarate et al. (2016) [248]; Colombia	Preparación y administración	CSB, carros, exclusas, batas, otras superficies	30 cm <sup>2</sup>	CP, 5-FU, Carbo-Pt	HPLC-MS/MS LOD= 10	CP= 38,9% (7/18) 5-FU= 44,4% (8/18) Carbo-Pt= 44,4% (8/18)	CP= 24220-1676490 5-FU= 77740- >4000000 Carbo-Pt= 12160-101200
Graeve et al. (2016) [75]; EE.UU.	Preparación y administración ingresados y externos oncología	Mesas, suelos, contenedor residuos, sillón, baño, teléfonos...	200 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem, ETP, MTX, Pacli	LOD= 5-5000	8,1% (5/62)	CP= 8 Gem= 50 Pacli= 20-50
Hetzel et al. (2016) [290]; Alemania	Preparación y administración	-	900 cm <sup>2</sup>	Gem, MTX, Iri, IF, CP, Doxo, Epi, ETP, Doce, Pacli, Topo	μ-LC-MS/MS LOD= 1,8-14,6 pg//mL	-	Resultados Positivos Gem, IF, CP, Pacli  Conc. máx Pacli= 28,5 ng/mL
Pacheco da Silva et al. (2016) [71]; Brasil	-	Guantes, cerraduras de puertas, placas de cerámica	-	CP, Doxo, Doce, 5-FU	UPLC-MS/MS LOD= 500-1000 pg/mL (5 mL)	0% (0/54)	-
Poupeau et al. (2016) [174]; Canadá	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (48 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD CP= 0,36 LOD IF= 0,95 LOD MTX= 0,97	CP= 34,7% (168/484) IF= 8,5% (10/484) MTX= 6,4% (31/484)	*Conc. (media; máx): CP= 27; 11.000 IF= 0,5; 440 MTX= 0,5; 7300
		Viales/Embalaje	-	CP, IF, MTX		CP= 31,7% (13/41)	*Conc. (media; máx): CP= 580,3; 130000
Schierl et al. (2016) [291]; Italia	Preparación (CSB y robot)	CSB, suelos, bandejas	Variable: 300-638 cm <sup>2</sup> (400 cm <sup>2</sup> )	CP	GC-MS/MS LOD= 0,3-0,7 según superficie	CSB= 59,1% (13/22) Robot= 68,2% (15/22)	CSB= 0,4-25,4 Robot= 0,5-160,3

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
		Guantes	-			CSB= 57,1% (4/7) Robot= 12,5% (1/8)	CSB= 0,4-96,7 Robot= 0,7
		Bolsas I.V.	-			CSB= 70% (14/20) Robot= 15% (3/20)	CSB= 1,6-2899 Robot= 0,5-9,4
Simon et al. (2016) [268]; Francia (2014)	Preparación	Ventana y mesa de trabajo del aislador	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem, Daca, MTX, Iri, Doxo, 5-FU, Citarab, Ganciclo	UPLC-MS/MS LOD= 10	<b>Sin CSDTD:</b> CP= 56,3%; Gem= 42,7%; IF= 39,6%; Ganciclo= 41,7%; Citarab= 39,6%; Iri= 8,3%; 5-FU= 6,3% <b>Con CSDTD:</b> CP= 41,1%; Gem= 38,9%; IF= 6,3%; Ganciclo= 2,1%; Citarab= 10,5%; Iri= 2,1; 5-FU= 3,2%	CP= 10-68450 Gem= 13-8930 IF= 11-3550 Iri= 1430 Ganciclo= 116-2620 Citarab= 103-2850 5-FU= 258-4620  Sin CSDTD > Con CSDTD
	-	Guantes	-			Sin CSDTD > Con CSDTD	0,55-556,8 ng según compuesto y técnica
Azari et al. (2017) [271]; Irán (2014-2016)	Preparación, limpieza áreas y cuidado pacientes	CSB, suelos (2 hospitales)	400 cm <sup>2</sup>	CP	GC-ECD LOD= 12000	30,3% (27/89)	CP= 58230-174500
		Dérmica (manos)				18,8% (6/32)	CP= 83,1-144,35 ng
Böhlandt et al. (2017) [292]; Alemania (2014-2015)	Hogares de pacientes	Superficies baños y cocina	Variable: 22- 5400 cm <sup>2</sup> (900 cm <sup>2</sup> )	CP, 5-FU, Platino	CP, 5-FU -> GC-MS/MS Pt -> Voltametría  LOD= 20-200 pg/muestra	CP= 65,4% (34/52) 5-FU= 23,2% (13/56) Pt= 71,3% (112/157)	*Conc. (P <sub>25</sub> ; máx): CP= 0,47; 283,3 5-FU= 0,44; 98,3 Pt= 0,06; 42,5
Roland et al. (2017) [251]; Canadá	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (66 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX	UPLC-MS/MS LOD CP= 0,36 LOD IF= 0,95 LOD MTX= 0,97	CP= 44,6% (308/691) IF= 14,2% (98/691) MTX= 7,2% (50/691)	*Conc. (media; máx): CP= 2,8; 14000 IF= 1,1; 1500 MTX= 0,6; 4800

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
		Viales/Embalaje	-	CP, IF, MTX		CP= 29,5% (18/61) IF= 1,6% (1/61) MTX= 3,3% (2/61)	*Conc. (media-máx): CP= 1520,5; 85000 IF= 0,7; 15 MTX= 49,7; 2900
Colombo et al. (2017) [293]; Canadá	Farmacia oncológica, área pacientes, otras áreas	(3 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	MTX, CP, IF, Doce, Pacli, 5-FU, VDS, VCN, VBT, Oxali-Pt	HPLC-MS/MS MDL (LOD)= 0,05-176,41	-	5-FU= 4200-33000 MTX= <LOD-463 CP= 3-23 VCN= 5-14 Pacli= <LOD-12
Crul et al. (2017) [176]; Países Bajos (2001-2011)	Preparación y zonas adyacentes (Monitorización 2001-2011)	(9 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, 5-FU, Platino	CP, IF, 5-FU -> GC/MS Pt -> AAS LLOQ= 1,3-250	Total= 10,7% (61/571) Preparación= 14,5% (43/296) Sala adyacente= 6,5% (18/275)	<LOD-276000
Sottani et al (2017) [257]; Italia (2009-2011)	Preparación y administración	CSB, suelos, manillas, bolsas I.V., viales, mostradores, estantes, bandejas, teclado PC, bomba... (8 hospitales)	100 cm <sup>2</sup>	CP, Gem, Doxo, Epi, 5-FU, Platino	HPLC-MS/MS LOD (CP, Gem)= 60 LOD (Doxo, Epi)= 500 LOD 5-FU= 1000 LOD Pt= 10	25% (193/771) Pt= 43,6% (95/218) CP= 30,4% (56/184) 5-FU= 12,9% (26/201) Gem= 13,6% (14/103) Doxo-Epi= 3,1% (2/65)	*Conc. (P <sub>50</sub> ; máx): Pt= 20; 121700 *Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): CP= 300; 51300 *Conc. (P <sub>90</sub> ; máx): Gem= 100; 183100 Doxo-Epi= <LOD; 1100 5-FU= 1000; 390000

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Dugheri et al. (2018a) [177]; Italia (2008-2017)	Preparación y administración	CSB ,suelo, manilla, baño, contenedores, PC, teléfonos, ... (9 hospitales)	400 cm <sup>2</sup>	Gem, Daca, MTX, CP, Iri, Platino, Doxo, Epi, Doce, Pacli, VBT, ETP, 5-FU, IF, VCN, Citarab, Mitom C, Topo, Ida, Melfalan, Fotemustina	LC-MS/MS Pt -> ICP-MS LOQ= 0,1-9	32,88% >LOQ (1583/4814) CP= 17,2% IF= 15,4% Gem= 8,6% Pt= 5,4% 5-FU= 4,4% Pacli= 4,1%	Daca= 0,8-8175 Gem= 0,8-138453 MTX= 2-27387 Iri= 0,8-49553 VBT= 1,2-279 Epi= 1,2-1364 Doxo= 3-1181 CP= 2-78075 IF= 1,8-214628 ETP= 3-1920 Doce= 1,2-27478 Pacli= 0,8-11635 5-FU= 3-236097 Pt= 0,1-2851 Mitomic= 2,8-463 VCN= 2,5-416 Ida= 4-1485 Citarab= 4-254,3

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Dugheri et al. (2018b) [232]; Italia (2009-2017)	Preparación y administración  (Monitorización 2009-2017)	CSB, suelo, sillón, grifo, bomba, baño, mesa, teléfono...	400 cm <sup>2</sup>	CP, Gem, Daca, MTX, Iri, Doxo, Epi, ETP, Doce, Pacli, 5-FU, IF, Platino, VCN, VBT, Citarab, Mitom C, Topo, Ida, Melfalan, Fotemustina	LC-MS/MS LOQ= 0,1-9	CP= 18,3% IF= 15,2% Gem= 8,8% Pacli= 4,4% Iri= 3,6% 5-FU= 2,4% Doce= 2,5% Daca= 1,7% Pt= 1,5% Doxo= 0,9% Ida= 1,1% Epi, VCN, ETP= 0,5%; MTX= 0,4%	*Conc. (P <sub>90</sub> ; máx): CP= 45; 44646 IF= 32; 214628 Conc. máx: Gem= 138008 Pacli= 5240 Iri= 49553; Daca= 3015 5-FU= 205555 Doce= 3105 Doxo= 1181 Epi= 1364 MTX= 27382 ETP= 1230 VCN= 385 Ida= 1485 Pt= 3315
Koller et al. (2018) [234]; Alemania	Oncología	Mostrador, balanza, desinfectante, suelos, soporte infusión, bomba, contenedor, ordenador	Variable: 180-2000 cm <sup>2</sup>	CP, 5-FU, Platino	CP, 5-FU -> GC-MS/MS Pt -> Voltametría LOD= 20-200 pg/muestra	CP= 50% Pt= 100% 5-FU= 100%	CP= 0,3-221 5-FU= 0,7-12619 Pt= 0,2-181.818
	Pacientes y enfermeros	Dérmicas	-				CP pacientes= 187-259
	Enfermeros	Guantes	-				CP= 1,9 5-FU= 49,4

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Chauchat et al. (2019) [180]; Canadá (2017)	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (83 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem, MTX, Iri, VBN, Doce, Pacli, 5-FU, Citarab	UPLC-MS/MS LOD: CP= 1; IF= 6; Gem, VBN= 4; MTX= 2; Iri= 3; Doce= 90; Pacli, 5-FU, Citarab= 40	Total= 45% (429/953) CP= 36%; Gem= 11,8%; 5-FU= 10,5%; MTX= 6,6%; IF= 4%; Iri= 2,9%; Citarab= 2%; Pacli= 0,5%; VBN= 0,4%; Doce= 0,1%	*Conc. (P <sub>75</sub> ; máx): CP= 4; 39000 Conc. máx: IF= 1300; Gem= 7200; MTX= 1700; Iri= 5000; 5-FU= 52000; Citarab= 880
Guichard et al. (2019) [265]; Suíza	Preparación	CSB, sala limpia, área logística	100 cm <sup>2</sup>	Gem, Daca, MTX, Peme, ETP, CP, Iri, Doxo, Epi, Doce, Pacli, VBN, VCN, VBT, 5-FU, Citarab, Fluda, Topo, Ganciclo, ...	UHPLC-MS/MS LLOQ= 1-25 ng/mL	-	Gem= 30-4504 Daca= 40-55580 Topo= 40 IF= 80-360 CP= 50-1900 Iri= 40-180 Doce= 400-1710 Pacli= 1350-1380 Citarab= 120-5120 Ganciclo= 80-50520
	-	Viales	-	IF, MTX, Doce, 5-FU		-	IF= 6200 Doce= 30
Hilliquin et al. (2019) [252]; Canadá (2018)	Farmacia y área de pacientes	CSB, suelos, encimeras, sillón, estantes, bandejas (79 hospitales)	600 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem, MTX, Iri, Doce, Pacli, VBN, 5-FU	UPLC-MS/MS LOD: CP= 1; IF= 6; Gem, VBN= 4; MTX= 2; Iri= 3; Doce= 90; Pacli, 5-FU= 40	Total= 44,8% (397/887)	*Conc. P <sub>90</sub> : Total= 98
Blahova et al. (2020) [294]; República Checa	Preparación, administración y oficinas (Monitorización 2008-2016)	Suelos, mesas, pomos, teléfonos, teclados, baños, pantallas ... (21 hospitales)	900 cm <sup>2</sup>	CP, 5-FU, Platino	CP, 5-FU -> UPLC-MS/MS Pt -> ICP-MS LOD CP= 1 LOD 5-FU= 7 LOD Pt= 0,2	CP= 49,3% Pt= 63%	*Conc. (media; máx): CP= 1,2; 33853 Pt= 0,8; 7343

Referencia	Zona investigada	Superficie	Área	Compuestos	Instrumentación – LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	% positivos	Rango Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )
Korcowska et al. (2020) [295]; Europa	Preparación y administración (Monitorización 2013-2015)	CSB, suelos, encimeras, neveras, sillones, contenedores, teléfonos (15 hospitales)	900 cm <sup>2</sup>	CP, IF, Gem, MTX, Doce, Pacli, Topo, Iri, Doxo, Epi, 5-FU	LC-MS/MS LLOQ: CP, IF= 1,8; Gem, Iri, Doxo= 0,4; MTX, Doce= 18,3; Pacli, 5-FU= 9,2; Topo, Epi= 3,7	100% hospitales Parte 1= 20% Parte 2= 14% Parte 3= 14%	*Conc. (media; máx): Parte 1= 12; 170500 Parte 2= 4; 36920 Parte 3= 6; 6500
Mucci et al. (2020) [296]; Italia (2018)	Preparación y administración	Suelos, pomos, baños ... (3 hospitales)	400 cm <sup>2</sup>	CP, IF	LC-MS/MS LOD CP= 0,2 LOD IF= 0,1	4,7% (39/829)	Conc. máx: CP= 14176 IF= 96315
		Guantes	-			0%	-
		Bolsas I.V., viales, embalaje	-			Solo viales positivos 100% (N= 25)	IF= 6,7-44,2
Verscheure et al. (2020) [297]; Algeria	Preparación y administración (6 departamentos)	CSB, mesas, pomos, sillas, teléfono, grifos, lavabo, nevera, calculadora, cajón	100 cm <sup>2</sup>	CP, IF, MTX, 5-FU	UPLC-MS/MS LOD CP, 5-FU= 100 LOD IF= 300 LOD MTX= 50	CP= 79,5% (31/39) IF= 30,8% (12/39) MTX= 56,4% (22/39) 5-FU= 66,7% (26/39)	Conc. máx: CP= 208850 IF= 23450 MTX= 10490 5-FU= 22220
		EPIs (guantes y máscaras)	315 y 800 cm <sup>2</sup>			70% (7/10) CP= 40% (4/10) IF= 10% (1/10) MTX= 30% (3/10) 5-FU= 30% (3/10)	CP= 30-790 IF= 180 MTX= 10-2660 5-FU= 10-2150
		Dérmicas (cara, manos y brazos)	650, 800 y 1200 cm <sup>2</sup>			61,5% (8/13) CP= 53,8% (7/13) IF= 7,7% (1/13) MTX= 0% 5-FU= 38,5% (5/13)	CP= 20-110 IF= 280 5-FU= 10-50

\*Estas concentraciones recogen el valor medio o el percentil y el valor máximo para cada sustancia.

5-FU= 5-fluorouracilo, Carbo-Pt= carboplatino, Cisp-Pt= cisplatino, Citarab= citarabina, Cloramb= clorambucilo, Conc.= concentración, CP= ciclofosfamida, Daca= dacarbazina, Dauno= daunorubicina, Doce= docetaxel, Doxo= doxorubicina, Epi= epirubicina, ETP= etopósido, Gem= gemcitabina, Ida= idarubicina, IF= ifosfamida, Iri= irinotecán, máx= máximo, Mitom C= mitomicina C, MTX= metotrexato, Oxali-Pt= oxaliplatino, Pacli= paclitaxel, Peme= pemetrexed, "Pad"= almohadilla, Pt= platino, Topo= topotecán, VBN= vinorelbina, VBT= vinblastina, VCN= vincristina, VDS= vindesina. P<sub>25</sub>= percentil 25, P<sub>50</sub>= percentil 50 o mediana, P<sub>75</sub>= percentil 75, P<sub>90</sub>= percentil 90.

### **1.5.5.2. Biomarcadores de efecto**

El término “biomarcador de efecto” hace referencia a una alteración bioquímica, fisiológica o conductual medible dentro de un organismo que, dependiendo de su magnitud, puede asociarse con una enfermedad o patología [181].

Conocer el mecanismo de acción por el que ejerce su efecto el agente a evaluar resulta imprescindible para la correcta selección del biomarcador más adecuado. De este modo, dado que los fármacos citostáticos producen un daño en el material genético, se pueden seleccionar distintos marcadores de genotoxicidad o combinaciones de ellos para lograr una mayor comprensión del daño causado. Sin embargo, estos marcadores no son específicos del agente causal, por lo que el daño evaluado puede ser debido a otros factores como la edad, el tabaco o la exposición a otros agentes, haciendo más compleja su interpretación [42; 79; 181].

Los biomarcadores de efecto más utilizados en los ensayos de evaluación de daño genotóxico incluyen aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y micronúcleos (conocidos como marcadores citogenéticos), y daño primario en el ADN. Otros ensayos menos frecuentes y menos específicos engloban los ensayos de mutación bacteriana, metabolitos urinarios, aductos de proteínas, síntesis no programada de ADN y mutaciones en células eucariotas [23; 181; 298-300].

#### **1.5.5.2.1. Aberraciones cromosómicas (CA)**

Las aberraciones cromosómicas ocurren debido a lesiones en la cadena de ADN que dan lugar a discontinuidades en la doble hélice [299], y se producen en regiones extensas de cromosomas completos [298].

Las lesiones primarias del ADN son reconocidas por enzimas reparadoras, por lo que la lesión puede ser corregida, dando lugar a la restitución de la secuencia original [299], o transformada, dando lugar a distintos tipos de cambios en el material genético como rupturas, supresiones, translocaciones, duplicaciones, circularización, acentrismo y dicentrismo [23; 298; 299]. De este modo, pueden distinguirse aberraciones estructurales y aberraciones numéricas [79; 299; 300]. Las aberraciones cromosómicas estructurales pueden producirse como resultado del daño directo en el ADN, replicación de una hebra de ADN dañada e inhibición de

la síntesis de ADN, entre otros mecanismos [301], y se pueden clasificar, a su vez, en 2 tipos según su morfología y mecanismo [79; 299; 302]:

- Aberraciones tipo cromosoma: aquellas que afectan a un mismo locus en ambas cromátides en uno o varios cromosomas. Generalmente reflejan roturas dobles de cadena no reparadas producidas en fase de reposo G0-G1 [79; 301].
- Aberraciones tipo cromátide: solo afectan a una de las cromátides en uno o varios cromosomas. Se originan a partir de varios tipos de lesiones (alteración de bases, enlaces cruzados, roturas simples de cadena) inducidas por agentes dependientes de fase S-G2 [79; 301].

Por su parte, las aberraciones cromosómicas numéricas hacen referencia a cambios en el número de cromosomas que se producen debido a una división celular anómala, y las células se clasifican como aneuploides si contienen unos pocos cromosomas más (hiperploides) o menos (hipoploides) que el número normal de la célula (46 cromosomas en el caso de los humanos), o poliploides, si contienen múltiplos de dicho número [301].

Las CA son el resultado de daño irreparable acumulado en el ADN. Este daño puede provocar una pérdida de material genético en las células hija, con la consiguiente disfunción y muerte celular, o puede ser transmitido a las siguientes generaciones celulares, caso de las translocaciones e inversiones y otros reordenamientos simétricos [23; 181]. Además, en general, las aberraciones tipo cromosoma provocan la muerte de ambas células hija, ya que las dos cromátides están afectadas, mientras que en las aberraciones tipo cromátide solo una cromátide se ve afectada por lo que solo influirá en una de las células hija [299]. Un aumento de la frecuencia de este biomarcador está asociado con un mayor riesgo de cáncer [301].

La evaluación de las CA debe realizarse en células en metafase, para lo cual se utiliza colchicina [299; 301; 302], que actúa como inhibidor de la mitosis a nivel de la metafase al inhibir la polimerización de la tubulina, impidiendo la formación del huso acromático y la separación y migración de las cromátides hacia los polos de la célula. Este test puede aplicarse tanto a líneas celulares como a cultivos primarios, incluyendo linfocitos de sangre

periférica [302], por lo es un biomarcador frecuentemente utilizado en estudios de biomonitorización.

#### **1.5.5.2.2. Intercambio de cromátides hermanas (SCE)**

El intercambio de cromátides hermanas se produce como resultado del intercambio simétrico de productos de replicación del ADN entre las cromátides hermanas en un mismo locus en respuesta a un daño en una de las cadenas de ADN [301], y no da lugar a alteraciones en el número o estructura del cromosoma [79; 298]. Por tanto, no se considera estrictamente una aberración como tal, aunque es susceptible de inducción química y se correlaciona con el potencial genotóxico de las sustancias [298].

El método para su evaluación consiste en la visualización del intercambio mediante tinción fluorescente y luz ultravioleta tras la incubación de las células con 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina, y permitiendo 2 ciclos de división celular. La luz ultravioleta permite diferenciar entre cromátides que han incorporado BrdU y aquellas que no lo han hecho [23; 298]. El ensayo para la determinación de SCE se considera un test muy sensible, rápido y sencillo, capaz de detectar efectos genotóxicos a concentraciones mucho más bajas que las requeridas para producir CA [79; 181]. Sin embargo, a pesar de que la inducción de SCE es indicativa de daño en el material genético, no proporciona evidencias suficientes para considerar un agente como mutágeno, no se ha establecido su relación con el riesgo de cáncer, y no se acepta su uso como ensayo único. Además, se sabe que BrdU es capaz de inducir SCE [79; 299; 301].

#### **1.5.5.2.3. Micronúcleos (MN)**

Los micronúcleos son pequeños conjuntos de material nuclear envuelto presentes en el citoplasma que se separan del núcleo principal durante la división celular. Su formación puede deberse a la rotura cromosómica (clastogénesis) o a una mala segregación de los cromosomas debido al mal funcionamiento del huso mitótico (aneugénesis) [79; 227; 298; 303; 304]. Los MN surgen en las células mitóticas a partir de fragmentos cromosómicos o de cromosomas completos que se quedan atrás en la anafase y no están integrados en los núcleos de las células hija [23; 227; 298]. Por lo tanto, son fragmentos cromosómicos acéntricos, es decir, sin centrómero, o cromosomas completos incapaces de migrar hacia los polos durante la anafase de la división celular [124; 181; 298; 299; 304-306], por lo que

proporcionan una medida de rotura cromosómica o pérdida cromosómica [181; 227; 307].

La formación de MN requiere de un ciclo de división celular tras la exposición al agente dañante [303; 304], por lo que, a diferencia de las CA, representa daño que ha sido transmitido a las células hija [305]. Por otro lado, la frecuencia de MN desciende a medida que la célula realiza más de un ciclo de división tras la exposición al agente [304]. Los MN representan, por tanto, un daño irreparable fijado en el ADN que ha sido transmitido a las células hija [308].

El aumento de la frecuencia de MN está asociado con el riesgo de cáncer en humanos [79; 309-312], por lo que puede jugar un papel importante como biomarcador en estudios de monitorización de exposición ocupacional a fármacos antineoplásicos en profesionales sanitarios [227; 308; 313].

La técnica convencional es imprecisa, ya que no permite distinguir entre las células que se han dividido y el resto de células, por lo que la estimación de la frecuencia de MN puede estar infravalorada [303; 306]. Fenech & Morley (1985) [306] propusieron 2 alternativas al método convencional para la evaluación de MN basadas en la identificación de células que han realizado la primera mitosis. La primera de ellas consiste en un método autorradiográfico que se basa en marcar las células con timidina tritiada. Sin embargo, este método produce MN por sí mismo, por lo que no tiene valor para medir daño *in vivo*. La técnica más comúnmente utilizada para evaluar la presencia de MN, conocida como "cytokinesis-block micronucleus assay" o ensayo CBMN, se basa en estimular el cultivo celular de forma que se permita la división nuclear, pero inhibiendo la división celular, lo que da lugar a células fácilmente reconocibles por su apariencia binucleada [79]. La citocalasina-B es la sustancia utilizada para bloquear la citocinesis al impedir la polimerización de los filamentos de actina, impidiendo así la contracción de la membrana plasmática y la división celular [303; 308]. Este ensayo permite, además, evaluar otros eventos como puentes nucleoplasmáticos (NPB) (biomarcador de cromosomas dicéntricos debidos a una mala reparación del ADN y/o fusiones terminales de telómeros) y "brotes nucleares" (NBUDS) (biomarcador de la eliminación de ADN amplificado o complejos de reparación de ADN, ambos marcadores de amplificación genética) [303; 307; 308]. La combinación con otras técnicas, como la hibridación fluorescente in situ (FISH), mediante la utilización de sondas de

ADN pancentroméricas, permite diferenciar los dos tipos de micronúcleos [79; 313].

Algunas características del método como la rapidez y facilidad de análisis, el bajo coste [312], su capacidad para ser realizado en cualquier tipo de células (linfocitos, eritrocitos, células bucales y nasales, células uroteliales, líneas celulares, tejidos) [79; 313], la existencia de protocolos estandarizados [303; 305], la evaluación o “scoring” automatizada y el mayor número de células evaluadas [79], su fiabilidad y buena reproducibilidad [308], así como la determinación de otros parámetros de genotoxicidad adicionales [304], lo han convertido en uno de los test citogenéticos estándar para determinar daño genético [303; 308]. No obstante, estudios recientes cuestionan la sensibilidad del ensayo CBMN en linfocitos con aplicación en el campo de la monitorización ocupacional debido a dos puntos críticos principales en el protocolo; por un lado, la pérdida de células dañadas debido a un excesivo tiempo de cultivo, lo que permite a las células dividirse más de una vez con el consiguiente descenso de MN, o la pérdida de la célula dañada por apoptosis; y por otro lado, debido a los procesos de reparación del ADN dañado antes de que se produzca la formación de micronúcleos [307].

#### **1.5.5.2.4. Ensayos de mutación bacteriana**

Estos test se dividen en 3 tipos: a) aquellos que detectan mutaciones previas, b) aquellos que detectan mutaciones directas, y c) aquellos que dependen de una deficiencia en la reparación del ADN [299]. Los más utilizados son los 2 primeros, siendo el más conocido el test de Ames, que se basa en la reversión de una mutación existente, para lo que utiliza varias cepas bacterianas mutadas de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar histidina, un aminoácido esencial. En ausencia de histidina estas cepas son incapaces de crecer, pero en presencia del agente dañante pueden mutar regresando a su genotipo salvaje, el cual es capaz de sintetizar histidina. De este modo, cultivando estas cepas con la orina de trabajadores expuestos se puede determinar la presencia de metabolitos capaces de causar daño en el ADN. Otros test han sido desarrollados utilizando diferentes especies bacterianas con mutaciones en distintas rutas metabólicas [298; 299; 314].

#### **1.5.5.2.5. Metabolitos urinarios**

Los procesos de reparación del ADN pueden dar lugar a la excreción en orina de bases modificadas que pueden ser utilizadas como medida del daño. Sin embargo, este marcador es muy poco específico e incluso puede ser producido como resultado de reacciones metabólicas de detoxificación del organismo debido a la acción sobre los componentes celulares de células muertas [23; 301].

#### **1.5.5.2.6. Aductos de proteínas**

La exposición a agentes químicos puede dar lugar a la formación de aductos con proteínas sanguíneas, tales como albúmina y hemoglobina, al reaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos, principalmente cisteína, histidina y valina. De este modo, mientras que el daño en el ADN tiende a ser reparado, estas modificaciones sobre las proteínas circulantes se van acumulando durante la vida útil de la proteína. Así, la hemoglobina puede proporcionar información relativa a la exposición previa durante una ventana de detección de varios meses, mientras que la vida media de la albúmina permite una ventana de detección más corta de aproximadamente 28 días [23; 181; 301].

#### **1.5.5.2.7. Síntesis no programada de ADN**

La síntesis no programada de ADN o UDS, por sus siglas en inglés, hace referencia a la síntesis de ADN durante la reparación de la escisión de ADN dañado, y que se diferencia de la replicación semiconservativa que tiene lugar durante la fase S del ciclo celular. Este ensayo es una medida de la cantidad de ADN reparado y se basa en la incorporación de nucleósidos marcados (principalmente timidina tritiada) detectados mediante autorradiografía. La cantidad de ADN asociada con UDS es relativamente baja si se compara con la síntesis semiconservativa, por lo que estas células en fase S son fácilmente eliminables del análisis debido a sus altos índices de marcaje. Por tanto, la detección de UDS es indicativa de la reparación del ADN después de la escisión y eliminación de una secuencia de ADN que contiene una región de daño inducido por agentes físicos o químicos [298; 299; 315].

#### 1.5.5.2.8. Mutaciones

El gen HRPT codifica para la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa implicada en el metabolismo de purinas [79]. Ésta es una enzima de membrana encargada de transferir purinas como la hipoxantina al interior de la célula [23]. La enzima cataliza la reacción de hipoxantina y guanina con fosforribosil-pirofosfato para el rescate de purinas [301]. Además, cataliza la conversión de análogos de purina como la 6-tioguanina en compuestos tóxicos para las células. Así, cuando se produce una mutación, la célula es deficiente en actividad enzimática HPRT y, por lo tanto, sobrevive al tratamiento con 6-tioguanina [79; 301].

Este gen se encuentra en el cromosoma X, lo que implica que solo existe una copia funcional del mismo. La mutación del gen HRPT provoca la deficiencia de la actividad enzimática y la supervivencia de las células cuando son tratadas con 6-tioguanina [23; 79; 301; 316].

El test HPRT se realiza en linfocitos de sangre periférica y es considerado el único test de mutación suficientemente estandarizado para ser utilizado como biomarcador [79].

#### 1.5.5.2.9. Daño en el ADN

El ensayo cometa, o electroforesis en gel de agarosa (SCGE), tiene como fundamento la migración hacia el ánodo de los fragmentos de ADN de bajo peso molecular cargados negativamente durante la electroforesis, creando una estructura similar a un cometa cuando se visualiza mediante microscopía de fluorescencia [317-320].

Este biomarcador ha sido utilizado en los experimentos de evaluación de daño genotóxico llevados a cabo para la realización de la presente Tesis Doctoral como parte de una estancia de investigación, por lo que se hablará con más detalle acerca de su fundamento en el capítulo II. La **Tabla 3** recoge las características de los estudios de evaluación de daño en el ADN en los que se aplicó el ensayo cometa, tales como la matriz usada, el número de participantes, los biomarcadores, la metodología y parámetros usados, y los resultados obtenidos.

**Tabla 3:** Estudios en los que se evalúa el daño en el ADN de los trabajadores expuestos a fármacos citostáticos mediante el ensayo cometa.

Artículo	Compuestos	Matriz	Participantes	Muestreo	Biomarcador	Metodología	Parámetro	Resultados
Fuchs et al (1995) [321]	CP, Doxo, ETP, Cis-Pt, 5-FU, VCN, IF, MTX, Citarab	Cé. mono-nucleares	91 expuestos (E) 54 controles (C)	-	*SCGE	-	-	*Expuestos sin protección > expuestos con protección (p<0,005) *Expuestos con protección = Control *Tras incorporar medidas, descenso del daño (p<0,001)
Ündeger et al. (1999) [322]	CP, MTX, 5-FU, Doxo, Cis-Pt, Bleomicina, IF, VBN, VCN, ETP	Linfocitos	30 enfermeros 30 controles	Al final de la semana laboral	SCGE	100 cometas/gel (2 gel)	Scoring visual (0-3)	Daño: E > C (p<0,05) No asociación daño-período de exposición Fumar no relacionado con daño Uso EPI menor daño (p<0,05)
Maluf et al. (2000) [141]	-	Linfocitos	-Inicial: 10 expuestos 10 controles -Tras 4 años: 12 expuestos 12 controles	2º día de trabajo tras 4 horas	*MN inicial *MN tras 4 años *SCGE tras 4 años	*MN: 2000 cé binucleadas *SCGE: 50 cometas	Scoring visual (0-4)	*MN inicial: E > C (p=0,038) *MN tras 4 años: p>0,05 *SCGE tras 4 años: E > C (p=0,0006)
Kopjar et al. (2001) [323]	CP, VCN, VBT, Cis-Pt, 5-FU, Bleomicina, MTX, Doxo	Linfocitos	50 expuestos 20 controles	-	*SCGE	N= 50 cometas	% ADN en cola, TL, TM	E > C (p<0,05)
Deng et al. (2005) [324]	MTX	Linfocitos	21 expuestos 21 controles	-	*SCGE *MN	*SCGE: 25 cometas/gel (2 gel) *MN: 1000 cé binucleadas	TL y TM	*SCGE (TL): E > C (p<0,01) *SCGE (TM): no diferencia E vs C *MN: E > C (p<0,01)

Artículo	Compuestos	Matriz	Participantes	Muestreo	Biomarcador	Métodología	Parámetro	Resultados
Laffon et al. (2005) [325]	CP, Cis-Pt, Doxo, MTX, Mitom C, 5-FU	Leucocitos	30 enfermeros 22 controles	-	*SCGE *MN	*SCGE: 50 cometas/gel (2 gel) *MN: 1000 cé. binucleadas	*SCGE: TL	*SCGE: E > C (p<0,01) *MN: E > C (no significativo)
Deng et al. (2006) [326]	VCN	-	15 expuestos 15 controles	-	*SCGE *MN	*SCGE: 25 cometas/gel (2 gel) *MN: 1000 cé. binucleadas	*SCGE: TL, TM	*SCGE: -TL: E > C (p<0,01) -TM: no diferencias (p>0,05) *MN: E > C (p=0,01)
Ursini et al. (2006) [132]	CP, IF, Gem, Citarab, 5-FU (monitorización ambiental)	*Linfocitos *Cé bucales (CB)	12 enfermeras HDía 13 enfermeras Onco 5 técnicos farmacia 30 controles	Inicio turno 3er día	SCGE	50 cometas	TM	*TM PBL: técnicos > C (p>0,05) *TM CB: HDía > C (p>0,05) Técnicos > C (p>0,05)
Yoshida et al. (2006) [327]	CP, Daca, Bleomicina, Doxo, Dauno, Pt, Doce, Pacli, ETP, Iri, VBN, VCN, VBT...	Linfocitos	19 enfermeras 18 controles	-	SCGE	-	TL	TL: E > C (p=0,004)
Mader et al. (2007) [142]	-	Linfocitos	15 expuestos (enfermeros) (T=0, T=1, T=3, T=6 y T=9 meses)	Nivel basal y durante 9 meses	*SCGE *SCE	*SCGE: 100 cometas *SCE: 50 cé. en metafase	Scoring visual (0-4)	*SCGE: aumento con el tiempo (p=0,02) *SCE: aumento significativo con T *SCE: T=6 y T=9 > T=0 (p<0,05)

Artículo	Compuestos	Matriz	Participantes	Muestreo	Biomarcador	Métodología	Parámetro	Resultados
Rekhadevi et al. (2007) [126]	Doxo, Cis-Pt, Carbo-Pt, Bleomicina, Endoxano	*Linfocitos *Cé. Bucales (CB)	60 expuestos (enfermeras) 60 controles	6º día de trabajo	*SCGE *MN	*SCGE: 50 cometas/gel (2 gel) *MN: 1000 cé. binucleadas	TL	*SCGE (TL) --> E > C (p<0,05) Daño >35 años vs <35 años (p<0,05) tanto en E como C *MN CB--> E > C (p<0,05) MN: daño >35 años vs <35 años (p<0,05) tanto E como C MN: >10 años exposición (p<0,05) *MN PBL--> E > C (p<0,05) MN: >35 años (p<0,05) tanto E como C MN: >10 años exposición (p<0,05)
Cornetta et al. (2008) [121]	-	Linfocitos	83 expuestos 75 controles	-	*SCGE *MN	*SCGE: 100 cometas/gel (2 gel) *MN: 1000 cé. binucleadas	*SCGE: % ADN en cola	*SCGE: E > C (p<0,001) *MN: E > C (p<0,0001)
Sasaki et al. (2008) [129]	-	Linfocitos	64 enfermeras no AD 57 enfermeras AD 46 controles	-	SCGE	-	TL y TM	Log TL: E total > C (p<0,05) Log TL: E AD > C (p<0,05) No diferencias AD vs no AD (p>0,05)
Cavallo et al. (2009) [328]	-	*Linfocitos *Cé. bucales	30 expuestos 30 controles	Inicio turno 3º día	*SCGE *MN	*SCGE: 50 cometas *MN: 1000 cé. binucleadas	*SCGE: % ADN en cola, TL, TM	*SCGE: -Linfocitos: no diferencia E vs C -Cé. Bucales: no diferencia E vs C *MN - Linfocitos. no diferencias E vs C -Cé. Bucales: E > C (p=0,042)
Kopjar et al. (2009) [140]	-	Linfocitos	50 expuestos (enfermeros y médicos) 50 controles	Chequeo médico regular	*SCGE *CA *SCE *CBMN Proliferación	*SCGE: 50-100 cometas/gel (2 gel)	*SCGE: TL y LTN	* SCGE: E > C (p<0,001) *CA: E > C (p<0,001) *SCE: E > C (p<0,001) *MN: E > C (p>0,05)

Artículo	Compuestos	Matriz	Participantes	Muestreo	Biomarcador	Métodología	Parámetro	Resultados
Rombaldi et al. (2009) [122]	CP, IF, Cis-Pt, Oxali-Pt y Doxo	Linfocitos	20 expuestos (farmacéuticos y enfermeros) 20 controles	Durante 1 semana	*SCGE *MN	*SCGE: 50 cometas/gel (2 gel) *MN: 2000 cé binucleadas	Scoring visual (0-4)	*SCGE: E > C (p<0,001) *MN E > C (p<0,01)
Connor et al. (2010) [212]	-	Leucocitos	68 expuestos 53 controles	-	SCGE	100 cometas	% ADN en cola, TM	No diferencia E vs C (p>0,05)
Villarini et al. (2011) [133]	CP, Citarab, Doxo, Epi, VCN, ETP, Fluda, Cis-Pt, MTX, Gem, 5-FU, Doce, Pacli, Mito C, IF, Ralti	Linfocitos	52 expuestos 52 controles	Final del turno >4 días trabajo	SCGE SCGE oxidat. SCGE reparac.	50 cometas/gel (3 gel)	TL, TI, TM	SCGE TI: E > C (p<0,05) Edad, sexo y tabaco --> no asociado Categoría laboral y antigüedad --> no diferencias Uso EPI --> menor daño (p<0,05)
Buschini et al. (2013) [329]	CP, Daca, Pt, Bleomicina, Ida, Cape, Citarab, Doxo, Epi, ETP, 5-FU, Dauno, Doce, Gem ...	Leucocitos	63 enfermeras 74 controles	Al final de 2º día de trabajo	*SCGE *SCGE oxidativo	100 cometas/gel (2 gel)	TI	*SCGE: no diferencia E vs C *SCGE oxidativo: E > C (p<0,001)
Izdes et al. (2015) [128]	CP, Cis-Pt, ETP, Doxo, 5-FU, VBT, VCN y Bleomicina (más usados)	Linfocitos	17 enfermeras gases 19 enfermeras AD 19 controles	-	SCGE	50 cometas/gel (2 gel)	Scoring visual (0-2)	E > C (p<0,05) No diferencia enferm. gases vs AD No diferencia años exposición E y C No diferencia fumadores vs no fumadores
Ladeira et al. (2015) [131]	CP, Pacli y 5-FU (más usados)	Linfocitos	46 trabajadores 46 controles	-	SCGE SCGE-Fpg	50 cometas	% ADN en cola	E > C (p>0,05)

Artículo	Compuestos	Matriz	Participantes	Muestreo	Biomarcador	Métodología	Parámetro	Resultados
Gajski et al. (2016) [330]	5-FU, MTX e Imatinib	Linfocitos	3 jóvenes sanos no fumadores	-	SCGE-Fpg MN SCE LPO y PC	100 cometas	-	*Viabilidad: [ ] $\geq 0,01 \mu\text{g/mL T=4 h}$ ( $p<0,05$ ) [ ] $\geq 0,00001 \mu\text{g/mL T=24h}$ ( $p<0,05$ ) *Daño SB [ ] $10 \mu\text{g/mL T=24h}$ ( $p<0,05$ ) *Daño oxidativo ( $p<0,05$ ) [ ] $\geq 1 \mu\text{g/mL T=4 h}$ [ ] $\geq 0,1 \mu\text{g/mL T=24 h}$ *SCE ( $p<0,05$ ) [ ] $\geq 0,000001 \mu\text{g/mL T=4 h y 24 h}$ *MN también significativo
Gajski et al. (2018) [331]	CP, Pacli y 5-FU	Linfocitos	2 jóvenes sanos no fumadores	-	*SCGE *MN *Viabilidad	*SCGE: 100 cometas *MN: 1000 cé. binucleadas	-	*Viabilidad y Daño [ ] = 10,5; 0,57 y 0,04 $\mu\text{g/mL T=24 horas}$ ( $p<0,05$ ) [ ] = 21,3; 1,13 y 0,08 $\mu\text{g/mL T=4 y 24 horas}$ ( $p<0,05$ ) [ ] $10 \geq 0,0001 \mu\text{g/mL T=4 y 24 horas}$
Negreli et al. (2020) [332]	-	*Linfocitos *Cé bucales	49 expuestos (farmacéuticos + enfermeros) 10 controles	Al final 5º día	*SCGE *MN	*SCGE: 100 cometas *MN: 1000 cé. binucleadas	Scoring visual (0-3)	*SCGE: E > C ( $p<0,05$ ) *MN: E > C ( $p<0,05$ )

5-FU= 5-fluorouracilo, AD= fármacos antineoplásicos, C= controles, CA= aberraciones cromosómicas, Cape= capecitabina, Carbo-Pt= carboplatino, CB= células bucales, CBMN= cytokinesis-block micronucleus assay Cé.= células, Cis-Pt= cisplatino, Citarab= citarabina, CP= ciclofosfamida, Daca= dacarbazina, Dauno= daunorubicina, Doce= docetaxel, Doxo= doxorubicina, Doxo= doxorubicina, E= expuestos, ETP= etopósido, Fluda= fludarabina, Gem= gemcitabina, IF= ifosfamida, Iri= irinotecán, LPO= lipid peroxidation, LTN= Long-Tailed Nuclei, Mitom C= mitomicina C, MTX= metotrexato, MN= micronúcleos, Oxali-Pt= oxaliplatino, Pacli= paclitaxel, PBL= peripheral blood lymphocytes, PC= protein carbonyls', Pt= platino, Ralti= raltitrexed, SCE= intercambio de cromátides hermanas, SCGE= single cell gel electrophoresis, T= tiempo, TI= Tail Intensity, TL= Tail Length, TM= Tail Moment, VBN= vinorelbina, VBT= vinblastina, VCN= vincristina.

### 1.5.5.2.10. Ensayos de citotoxicidad

Además de los ensayos de genotoxicidad mencionados anteriormente, es importante evaluar la citotoxicidad en las células para realizar una correcta interpretación de los resultados. Los ensayos de citotoxicidad son ensayos de viabilidad o proliferación celular utilizados para evaluar la presencia de daño excesivo que provoca la muerte celular y determinar así el porcentaje de células viables tras la exposición a un agente peligroso. Se considera válido una viabilidad mínima del 80% con respecto al valor del grupo control [333; 334].

El test de viabilidad más común es el ensayo de exclusión con azul de tripano, en el cual las células sanas son impermeables al colorante debido a la resistencia de la membrana plasmática, y se asume que las células que captan el tinte y presentan coloración oscura bajo el microscopio óptico deben estar muertas, debido a que estas células tienen una membrana desestabilizada [333; 335-339]. Sin embargo, este ensayo lo que mide es la permeabilidad de la membrana celular sin que ello implique una pérdida de viabilidad, ya que las células pueden reparar la membrana dañada, recuperarse y sobrevivir [319; 333].

Otros tests más específicos son los ensayos funcionales, los cuales determinan la viabilidad celular mediante la evaluación de componentes del metabolismo celular que resultan esenciales para el crecimiento de la célula, partiendo de la premisa de que el daño celular originará la pérdida de la capacidad para mantener y proporcionar energía necesaria para llevar a cabo la función metabólica y el crecimiento [340; 341]. Dentro de esta categoría se pueden incluir distintos ensayos con diferentes colorantes. Destaca así el ensayo rojo neutro que utiliza el colorante con el mismo nombre. Este ensayo se basa en la incorporación del tinte por parte del compartimento endosomal de células con membranas no dañadas, tanto plasmática como endosomal. La cuantificación del colorante incorporado se realiza mediante absorción a 540 nm, dándose una relación lineal entre el número de células vivas y la absorción [337; 341; 342].

Destaca también el ensayo con el colorante cristal violeta, el cual se utiliza para evaluar la viabilidad de las células que han sido fijadas a la placa de cultivo. Las células muertas se desprenden del fondo de la placa y son eliminadas durante el proceso, por lo que no captan el colorante. La

evaluación cuantitativa se realiza mediante un lector de placa a 570 nm [343; 344].

Otro conjunto de tests de viabilidad también basados en métodos colorimétricos para la determinación de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad, los cuales evalúan la actividad enzimática mitocondrial, consisten en el empleo de sales de tetrazolio. Las características de estos ensayos de citotoxicidad se explicarán con más detalle en el capítulo II, dado que forman parte de la metodología analítica desarrollada en la presente Tesis Doctoral para la evaluación del daño citotóxico-genotóxico realizada durante una estancia de investigación.

### **1.5.5.3. Biomarcadores de susceptibilidad**

Los biomarcadores de susceptibilidad son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición frente a una sustancia xenobiótica [79; 181; 300]. De este modo, a pesar de sufrir exposiciones similares, se pueden producir variaciones en la respuesta entre distintos individuos. Un ejemplo claro puede evidenciarse en el diferente comportamiento que puede tener un fármaco en función del individuo, ya sea debido a la ausencia de efecto, un efecto potenciado o reacciones adversas de mayor intensidad. Todo esto es debido a diferencias en las rutas metabólicas entre distintos organismos, codificadas a nivel genético, lo que se conoce como polimorfismo. Los polimorfismos son independientes de la exposición y, aunque son mayormente heredados, también pueden ser adquiridos debido a la exposición previa a otros agentes [181]. Se distinguen 2 tipos de polimorfismos genéticos: aquellos producidos en genes que regulan el metabolismo de un xenobiótico, y los polimorfismos en genes implicados en la reparación del ADN [79].

- Polimorfismo de genes implicados en el metabolismo: uno de los más conocidos y estudiados es el polimorfismo de enzimas de la familia de la glutatión-S-transferasa (GST), implicadas en el metabolismo de fase 2. Otros polimorfismos han sido documentados en enzimas N-acetil-transferasas, UDP-glucuronosiltransferasas y en dos isoenzimas del citocromo P-450, las isoformas CYP1A1 y la CYP2D6, entre otros muchos [23; 181].

- Polimorfismo en genes reparadores del ADN: los genes XRCC1 y XRCC3 codifican distintas enzimas implicadas en los procesos de reparación del ADN, por lo que cambios en su secuencia pueden dar lugar a una reducción de la actividad enzimática, con la consiguiente pérdida de eficacia reparadora [79].





## **II. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS**





Las técnicas instrumentales utilizadas para la elaboración de la presente Tesis Doctoral están basadas, por un lado, en técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas empleadas para el desarrollo de los métodos analíticos que permitieron identificar y cuantificar distintos fármacos citostáticos en muestras de superficies de trabajo, brazaletes y orina de trabajadores expuestos y, por otro lado, en el ensayo cometa y ensayos de viabilidad utilizados para evaluar biomarcadores de daño genético y daño citotóxico, respectivamente, tras la exposición a distintas concentraciones de varios fármacos citostáticos en un modelo experimental de células humanas procedentes de un linfoma histiocítico.

El grupo de investigación FORTOX en el que se realizó esta Tesis Doctoral tiene amplia experiencia en el desarrollo de metodologías basadas en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas [345-352], por lo que se abordará con mayor detalle los fundamentos y características del ensayo cometa y de los ensayos de viabilidad celular, dado que son técnicas no aplicadas en este laboratorio y que fueron utilizadas como parte de la metodología desarrollada durante la etapa de estancia para la evaluación de biomarcadores de daño en las células expuestas a fármacos citostáticos “*in vitro*”.

### **2.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)**

Un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento o HPLC, se caracteriza por el empleo de una fase estacionaria (columna analítica) de diámetro y longitud variable compuesta por partículas de pequeño tamaño, y una fase móvil (formada por los disolventes de elución) que arrastra los compuestos a través de dicha columna. La fase estacionaria está constituida por un soporte sólido de composición variable, cuyas características se seleccionarán en función de las propiedades físico-químicas de los compuestos a analizar, empaquetado generalmente en un cilindro de acero inoxidable. La técnica de cromatografía líquida se puede clasificar en 4 tipos en función de la naturaleza de la fase estacionaria y el mecanismo de interacción. Así, hablamos de cromatografía líquida de adsorción, de reparto, de intercambio iónico y de exclusión molecular. A su vez, dentro de la cromatografía de reparto podemos diferenciar 2 tipos en relación a las polaridades relativas de la fase móvil y la fase estacionaria, encontrándonos la cromatografía de fase normal (formada por una fase estacionaria polar y

una fase móvil apolar), y la cromatografía de fase reversa (compuesta por una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar). En ambos tipos, la fase estacionaria se compone, generalmente, de sílice, aunque también existen fases estacionarias poliméricas o con alúmina o carbono, sobre la cual se enlazan químicamente distintos grupos funcionales.

En el caso de la cromatografía líquida de reparto en fase reversa, que ha sido la utilizada en el desarrollo de los métodos analíticos descritos en la presente Tesis Doctoral, la fase estacionaria se caracteriza por la unión de grupos alquilo (dimetilsililo, octilo (C8) y octadecilo (C18)) o fenilo sobre el soporte de sílice. En cuanto a la fase móvil, se utiliza una mezcla de disolventes de distintas polaridades, principalmente agua junto con un modificador orgánico como metanol o acetonitrilo, que será el responsable de la elución de los compuestos más apolares. El sistema de trabajo empleado puede ser en modo isocrático, en el cual la composición de la fase móvil se mantiene constante durante la separación, o en modo gradiente, en el que la composición de la fase móvil se va modificando a lo largo de la separación [353-356].

El término HPLC se debe a que la fase móvil es bombeada a alta presión a través de la fase estacionaria para lograr vencer la resistencia que ésta ofrece. Una variante de esta técnica es el sistema UHPLC (cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento), patentado por Waters Corporation con el nombre de UPLC<sup>®</sup>, que utiliza columnas analíticas con menor tamaño de partícula y emplea una mayor presión de bombeo de la fase móvil para lograr valores de eficacia más elevados, lo que proporciona una mayor sensibilidad y resolución y permite reducir los tiempos de análisis por muestra [357].

Por su parte, la espectrometría de masas (MS) se basa en la ionización y fragmentación de las moléculas orgánicas en estado gaseoso para permitir su detección en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Cada compuesto presenta un patrón de ionización y fragmentación característico, lo que hace de esta técnica un método de detección muy selectivo para el análisis de sustancias, tanto en aplicaciones cualitativas como cuantitativas. Los espectrómetros de masas se pueden dividir en 3 partes principales: interfaz o fuente de iones, analizador y detector.

Los espectrómetros de masas se usaron tradicionalmente acoplados a cromatógrafos de gases ya en la década de 1950 [358]. Sin embargo, la

ionización tenía lugar mediante impacto electrónico (EI) utilizando una corriente de electrones a alta energía (70 eV), lo que da lugar a una gran fragmentación de los compuestos. La aplicación de EI produce una ionización fiable con una amplia fragmentación que origina espectros robustos que constituyen la “huella dactilar” de la molécula, lo que permitió crear librerías de datos [359].

Uno de los mayores inconvenientes del acoplamiento entre LC y MS era la transferencia de moléculas disueltas en la fase móvil líquida hacia la región de alto vacío del espectrómetro de masas donde se opera con moléculas cargadas en estado gaseoso. De este modo, fue necesaria la introducción de interfaces que permitiesen resolver las incompatibilidades derivadas de dicho acoplamiento. Numerosos sistemas han sido empleados para permitir el paso de moléculas desde el cromatógrafo de líquidos hacia el espectrómetro de masas, aunque solo uno ha logrado imponerse. Se trata del sistema API (Atmospheric Pressure Ionization), del que se derivan varias interfaces distintas: la interfaz ESI (ElectroSpray Ionization), más extendida y con mayor número de aplicaciones, la interfaz APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), la interfaz APPI (Atmospheric Pressure Photolionization) y la interfaz MALDI (Matrix-Assisted Laser Adsorption/Ionization). Una fuente o sistema API consta de cuatro componentes: 1) dispositivo de introducción de muestra (capilar), 2) cámara de ionización, 3) cono de muestreo, y 4) sistema de transferencia de iones.

Dado que la técnica utilizada en la metodología analítica descrita en esta Tesis Doctoral consistió en el empleo del sistema LC-ESI-MS/MS, se abordará la interfaz ESI con mayor detalle.

En la interfaz ESI tiene lugar la evaporación e ionización simultánea del analito a presión atmosférica. La formación del spray en el capilar de introducción de muestra se ve favorecida por una corriente coaxial de nitrógeno (gas de nebulización o API gas). Mediante la aplicación de voltaje y la creación de un campo eléctrico entre el capilar y el orificio de entrada al MS, los iones de la misma polaridad migran hacia el extremo del capilar donde el líquido forma un cono (cono de Taylor) del que se generan pequeñas gotas altamente cargadas, las cuales se van haciendo cada vez más pequeñas según van avanzando en su recorrido por la fuente. La extracción de los iones hacia la región de vacío intermedio se realiza mediante un recorrido ortogonal, por lo que recibe el nombre de Z-spray. La interfaz ESI

se caracteriza por producir una ionización suave de las moléculas en la cámara de ionización, lo que resulta en una reducida fragmentación de las mismas, siendo la especie mayoritaria el ión pseudomolecular  $M+H^+$  o  $M-H^-$ , en función de si se trabaja en modo positivo o negativo, respectivamente. Sin embargo, se puede provocar su fragmentación mediante la aplicación de voltaje, lo que provoca la aceleración de los iones y su colisión con moléculas de disolvente o de gas, y permite incrementar la especificidad de la técnica y proporcionar información estructural de la molécula. Este proceso de fragmentación se conoce como disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés), y tiene lugar en la cámara de ionización en el caso de un espectrómetro de masas simple, o en la celda de colisión, en el caso de espectrómetros de masas en tándem.

Los analizadores separan los iones en función de su relación  $m/z$ . Existen distintos tipos de analizadores que se diferencian en el modo de realizar la separación, siendo el cuadrupolo el empleado en la presente Tesis Doctoral. Este analizador consta de 4 rodillos circulares dispuestos en paralelo a los que se les aplica corriente continua, presentando un par opuesto voltaje positivo, y el otro par voltaje negativo. Al aplicar además un potencial de radiofrecuencia los iones que presenten una determinada relación  $m/z$  atravesarán el cuadrupolo y llegarán al detector. Los analizadores de tipo cuadrupolo presentan dos modos de trabajo: modo SIM (Single Ion Monitoring), en el cual se fijan las condiciones para que sólo pase un ión con una determinada  $m/z$ , o modo Scan, en el cual realiza un barrido de masas entre un determinado intervalo de  $m/z$ . Cabe mencionar también otros analizadores como la trampa de iones (IT) o los analizadores por tiempo de vuelo (TOF). Los analizadores TOF y los analizadores Orbitrap (una modificación de la tradicional IT) son considerados analizadores de alta resolución.

Una modificación del MS consiste en la combinación de “tres” cuadrupolos en un mismo espectrómetro, conocida como espectrometría de masas en tándem o de triple cuadrupolo (MS/MS o QqQ), uno de los cuales, situado entre los otros dos, actúa como una celda de colisión. En la celda de colisión se aplica un potencial de radiofrecuencia y un gas inerte, generalmente Helio o Argón, para provocar la aceleración de los iones y su fragmentación controlada al chocar con las moléculas del gas mediante el proceso de disociación inducida por colisión. De este modo, se selecciona el

ión precursor en el primer cuadrupolo (Q1), el cual es fragmentado en la celda de colisión (Q2) originando el/los iones producto que son seleccionados en el tercer cuadrupolo (Q3). Esta modificación otorga una mayor selectividad y sensibilidad ya que los iones seleccionados en Q3 solo pueden provenir del ión con una determinada  $m/z$  seleccionado en Q1 [345; 354; 358; 360-366]. Este modo de trabajo se conoce como MRM (Multiple Reaction Monitoring), en el cual ambos cuadrupolos operan en modo SIM.

La utilización de distintos analizadores en un mismo espectrómetro, principalmente combinaciones de cuadrupolos con analizadores de masas de alta resolución (HRMS), ha dado lugar a la aparición de los denominados analizadores de masas en tándem híbridos entre los que se encuentran Q-TOF y Q-Trap, en los cuales el tercer cuadrupolo se sustituye por un analizador por tiempo de vuelo o un Orbitrap, respectivamente. Debido a las características de estos HRMS se puede determinar la masa exacta y la fórmula molecular de los componentes presentes en muestras complejas [358; 363; 364].

La combinación de cromatografía líquida con espectrometría de masas aúna la capacidad de separación física de los componentes de una muestra con la capacidad de detección selectiva y confirmación de la identidad molecular de los compuestos, lo que la convierte en una técnica muy específica ampliamente utilizada y con múltiples aplicaciones en el campo de la Toxicología. Además, permite solventar las carencias de detección de la cromatografía de gases para determinados compuestos, siendo utilizada para la identificación de compuestos poco volátiles, polares y termolábiles [364; 367].

## **2.2. Ensayo cometa o “Single cell gel electrophoresis” (SCGE)**

Los inicios de esta metodología se remontan a hace más de 40 años cuando en 1978 Rydberg y Johanson cuantificaron por primera vez el daño en el ADN de células individuales mediante la lisis en una matriz de agarosa bajo condiciones alcalinas suaves [318; 368-370]. Observaron, además, que la separación de la cadena de ADN en medio alcalino se produce sin dispersión del ADN de cada célula [370]. En 1976, Cook et al. [371] desarrollaron una metodología de lisis celular basada en la utilización de detergentes no iónicos y una alta concentración de cloruro sódico con el objetivo de estudiar las estructuras nucleares. Este tratamiento elimina las

membranas plasmática y nuclear, el citoplasma y el nucleoplasma, y solubiliza los núcleos de histonas de los nucleosomas, de modo que lo que permanece es una matriz nuclear formada por ADN, ARN y proteínas conocida como nucleoide [318-320; 372]. Unos años después, Östling y Johanson (1984) [373] desarrollaron una técnica de electroforesis en microgel de agarosa en condiciones neutras [334; 368; 369] y visualizaron por primera vez un “cometa”, aunque no lo bautizaron como tal [319]. Sin embargo, a pH neutro solo se pueden detectar roturas dobles de la cadena del ADN y, debido a que muchos agentes químicos inducen entre 5 a 2000 veces más roturas simples de cadena que roturas dobles, se estaba perdiendo gran cantidad de daño y, por tanto, infravalorando el resultado [301; 334; 368; 369]. Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método, Singh et al. (1988) [368] introdujeron una modificación que permitía optimizar las etapas de desnaturalización y migración del ADN, y consistía en la lisis y electroforesis de las células embebidas en la matriz de agarosa bajo condiciones alcalinas (pH >13) [334; 369]. A valores de pH >12 se consigue la desnaturalización y desenrollamiento del ADN debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas de ADN; en condiciones de pH >12,6 los sitios lábiles alcalinos son convertidos en roturas de cadena; y a pH >13 se produce la máxima expresión de roturas simples de cadena [301; 334]. Este valor de pH fue considerado óptimo por el Taller Internacional sobre Procedimientos de Evaluación de Genotoxicidad (IWGTP) en 1999 [334], así como también lo reconoce la OCDE en su guía nº 489 sobre el ensayo cometa alcalino [317].

De este modo, el ensayo cometa alcalino, en su versión estándar, es capaz de detectar roturas directas de cadena, tanto simples como dobles, así como sitios lábiles alcalinos que se producen debido al daño en el ADN y son convertidos en roturas de cadena [317; 372; 374; 375]. Las roturas de cadena pueden formarse debido a la modificación directa del ADN causada por un agente químico o sus metabolitos, al proceso de reparación celular, o debido a la apoptosis. La rotura directa se produce cuando especies reactivas de oxígeno interaccionan con el ADN. Por su parte, los sitios lábiles alcalinos se generan por depurinación de la base dañada de un nucleótido, dejando un sitio apurínico/apirimidínico (sitio AP), y su conversión en un sitio abásico por una AP endonucleasa, el cual se transforma en rotura de cadena mediante tratamiento alcalino [23; 308; 317; 370; 374]. La presencia de roturas en la cadena de ADN relaja el superenrollamiento de la estructura helicoidal de

doble hélice y permite la migración de los fragmentos hacia el ánodo al aplicar voltaje [318; 333; 372].

Por otro lado, se ha visto que los agentes alquilantes/intercalantes que producen enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteína reducen la capacidad de migración de los fragmentos de ADN durante la electroforesis [333; 334; 376; 377]. Sin embargo, mediante una modificación del ensayo cometa basado en esta capacidad de retrasar la migración del ADN, se pueden detectar estos agentes intercalantes [378].

También se pueden identificar otros tipos de daño en el ADN mediante modificaciones del ensayo cometa estándar que consisten en la introducción de endonucleasas específicas de lesión. Estas enzimas detectan lesiones específicas en la cadena de ADN, eliminan la base nitrogenada dañada y crean un sitio AP, convirtiéndolo en rotura de cadena. De este modo, combinan una actividad glicosilasa y una actividad AP liasa. Se puede así detectar daño oxidante, alquilante, dimerización, etc, mediante enzimas como la formamido-pirimidina ADN glicosilasa (FPG), que detecta purinas oxidadas, formamido-pirimidinas y aductos producidos por agentes alquilantes; la 8-oxo-guanina ADN glicosilasa (OGG1), que detecta solo purinas oxidadas y formamido-pirimidinas, siendo así más específica de daño oxidativo; la endonucleasa III, que detecta pirimidinas oxidadas; la T4 endonucleasa V, que detecta dímeros de pirimidina; la 3-metiladenina ADN glicosilasa II (AlkA), que detecta 3-metiladenina; y la uracil ADN glicosilasa, que detecta errores en la incorporación de uracilo [318; 319; 333; 372].

Otra modificación consistiría en la utilización de la técnica FISH y sondas de ADN marcadas para reconocer cromosomas, regiones cromosómicas o genes específicos, lo que permitiría evaluar el daño en zonas específicas del genoma [319; 379; 380].

La metodología del ensayo cometa es sencilla e implica 7 etapas: preparación de la suspensión de células en agarosa, lisis, tratamiento alcalino, electroforesis, neutralización, tinción, y visualización y recuento [334]. Sin embargo, existen 4 puntos críticos que deben ser optimizados con el fin de mejorar la sensibilidad del método: 1) la concentración de agarosa para preparar el gel, 2) la densidad celular, 3) el tiempo de incubación alcalina y 4) el voltaje empleado en la electroforesis [318; 333]. En relación a otros aspectos, cabe destacar el uso de distintos tintes como naranja de acridina,

que emite fluorescencia verde o roja en función de su unión a cadenas de ADN dobles o simples, respectivamente; bromuro de etidio, un colorante intercalante con preferencia por ADN bicatenario; o DAPI, una sonda específica de ADN que forma un complejo fluorescente uniéndose al surco menor del ADN en secuencias ricas en adenina-timina, entre otros, lo que puede afectar a la intensidad de fluorescencia [319; 333; 334; 370; 381]. También existen distintas metodologías de evaluación del daño, que van desde el recuento visual a la utilización de técnicas de imagen automatizadas. Éstas últimas miden la cantidad de ADN en la cola del cometa en comparación con la cabeza [333]. En el recuento visual se asignan unidades arbitrarias de daño en función de la forma del cometa, que van desde 0 (ausencia de daño) hasta 4 (ADN altamente dañado) [319; 333], aunque algunos autores utilizan una escala diferente [128; 322; 382]. Azqueta et al. (2011) [383] evaluaron distintos métodos de recuento de daño causado por un agente alquilante (metilmetanosulfonato o MMS) y un agente oxidante (peróxido de hidrógeno), y no encontraron diferencias significativas en la sensibilidad entre los diferentes métodos.

La simplicidad del método, la alta sensibilidad para detectar bajos niveles de daño, el bajo número de células necesarias, la rapidez del ensayo, el hecho de no requerir equipamiento específico, el bajo coste [79; 308; 318; 319; 334; 374] y la utilización de cualquier tipo celular [301; 317] han permitido su aplicación en humanos en diferentes campos como estudios clínicos, estudios nutricionales y relacionados con el estilo de vida, y estudios de biomonitorización de exposición ambiental y exposición ocupacional [319; 333; 369; 372; 384]. Las células sanguíneas blancas son las utilizadas con mayor frecuencia debido a su facilidad de obtención y no necesidad de desagregación [319; 333], y al circular por el torrente sanguíneo pueden ser un reflejo del estado de exposición general del organismo [308]. Además, en los estudios de biomonitorización en humanos, el ensayo cometa refleja el estado de exposición del individuo con una ventana de detección de unas pocas semanas atrás, mostrando un daño temprano que todavía puede ser reparado [131; 141; 308]. La Conferencia Internacional de Harmonización (ICH) [385] reconoce el ensayo cometa como un ensayo complementario en la evaluación "*in vivo*" de la capacidad genotóxica de los compuestos debido a algunas ventajas tales como su habilidad para detectar distintos tipos de daño, la evaluación de dicho daño a nivel de células individuales y su aplicación a cualquier tipo celular o tejido, incluso en células pertenecientes

a tejidos que son el sitio primario de contacto con el agente tóxico, como células de la mucosa oral y nasal; en comparación con los ensayos citogenéticos (CA, MN y SCE) que se limitan a poblaciones de células en proliferación [308; 320; 375; 384; 386]. El ensayo cometa, en combinación con el test de MN, se presenta como una metodología útil para determinar la capacidad genotóxica de los agentes químicos, ya que permite evaluar distintos marcadores, potenciando de este modo su capacidad predictiva. Así, las diferencias entre ambas técnicas se basan en variaciones en el tipo de alteraciones sobre el ADN que estos ensayos pueden percibir. De este modo, el ensayo cometa detecta lesiones que todavía pueden ser reparadas, mientras que el test de MN, y los demás marcadores citogenéticos, detectan alteraciones que han persistido al menos durante un ciclo de división celular [141; 308; 384; 387].

Sin embargo, las lesiones detectadas mediante el ensayo cometa (roturas de cadena simples y dobles, y sitios lábiles alcalinos) muestran un daño que todavía puede ser reparado [79; 308], lo que ha dado lugar a los ensayos de reparación mediante el ensayo cometa. La capacidad de reparación del ADN es un factor esencial en la aparición de mutaciones y lesiones cancerosas. Así, cuanto mayor sea la capacidad de reparación más rápido puede ser eliminada una lesión y menos probable se espera que sea la aparición de una mutación. Sin embargo, no se puede relacionar una menor capacidad de reparación con un mayor incremento del riesgo de cáncer, y son necesarias más evidencias para poder considerarse como un marcador de susceptibilidad [372; 388]. Por otro lado, el ensayo de reparación puede servir para estimar la cinética de reparación que presentan las células tras la exposición a un agente dañino. Así, mientras que la reparación de roturas simples de cadena producidas por la exposición a agentes como peróxido de hidrógeno puede ser realizada en menos de 30 minutos, la reparación de roturas dobles o bases oxidadas puede llevar horas [319; 333; 372].

Además, algunos estudios sugieren que el ensayo cometa es capaz de detectar células apoptóticas visualizadas como una pequeña cabeza con una larga cola (imagen conocida como erizo) [334; 374]. Sin embargo, R. Collins, en una revisión publicada en 2004, establece que las células con forma de "erizo" pueden reparar el daño, y dado que la apoptosis es un proceso irreversible, no puede atribuirse a este fenómeno [319]. Por otro lado,

P. Singh (2000) [389] describió la forma que podría presentar una célula apoptótica y necrótica. Así, dado que la apoptosis es un proceso programado, da lugar a una gran fragmentación del ADN, lo que originaría una imagen como un halo de ADN con unos límites poco definidos y con apariencia de bruma. Por su parte, la célula necrótica presentaría un núcleo más grande poco definido con un límite externo claro y una apariencia del halo relativamente homogénea. Por el contrario, las células con ADN dañado (no necróticas ni apoptóticas) están claramente definidas y los núcleos presentan un halo más grande con un límite exterior bien definido.

### **2.3. Viabilidad celular**

Los ensayos de viabilidad realizados tras la exposición de las células a un agente físico, químico o biológico permiten determinar la citotoxicidad mediante la determinación del número de células viables. Estos ensayos son necesarios como paso previo a la evaluación del daño en el material genético, ya que un daño excesivo sobre las células que provoque la pérdida de la integridad celular, dando lugar a la muerte de la célula, conducirá a una mala interpretación de los resultados en los ensayos de genotoxicidad.

Además de los ya mencionados ensayos funcionales con rojo neutro o cristal violeta, destaca un conjunto de ensayos que comparten un fundamento común. Se trata de ensayos colorimétricos para la determinación de células viables basados en la reducción de un compuesto tetrazólico para dar lugar a la formación del producto formazán mediante la acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales. De este modo, la reducción solo se produce en células metabólicamente activas y la cantidad de producto formado es una medida directa del número de células viables. Existen diferentes reactivos comerciales que se diferencian en la composición del compuesto tetrazólico y las características del producto formado. Así, el ensayo MTT, que debe su nombre al reactivo [bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio], da lugar a la formación del producto formazán intracelular de color púrpura insoluble en el medio de cultivo, por lo que requiere una etapa de solubilización con disolventes. La cuantificación de las células viables se realiza a 570 nm con un espectrofotómetro visible [337; 338; 340; 341; 390]. A diferencia del ensayo MTT, considerado un método terminal ya que utiliza sistemas de tinción destructivos [391], en el ensayo de resazurina, un compuesto también de origen tetrazólico [392], el producto de la reacción de reducción da lugar a

un compuesto fluorescente no tóxico que difunde al medio de cultivo permitiendo la monitorización continua de las células post-tratamiento [338; 340; 391; 393; 394]. Otros reactivos comerciales que dan lugar a los ensayos con su mismo nombre incluyen el reactivo INT (producto formazán rojo) [337; 395], XTT (producto formazán naranja) [394], WST-1 [390], WST-8 [396] y MTS [390].

El ensayo de viabilidad MTS o CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ha sido el utilizado para evaluar la citotoxicidad de los fármacos citostáticos en los experimentos llevados a cabo durante la estancia realizada durante la etapa de Tesis. Este reactivo contiene un nuevo compuesto tetrazólico [sal inerte de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio o MTS] y un agente acoplante de electrones (etosulfato de fenazina o PES) que acelera la reducción del sustrato y es necesario para permitir al agente tetrazólico atravesar las membranas celulares [340; 397]. El MTS es reducido biológicamente por las células en un producto coloreado azulado llamado formazán, que es soluble en el medio de cultivo. Para que esta conversión tenga lugar deben intervenir las coenzimas NADPH o NADH producidas por las enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas, por lo que el producto formado es directamente proporcional al número de células vivas. El formazán produce absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, que es medido mediante un espectrofotómetro visible para determinar el número de células viables con respecto al control [398]. A diferencia del ensayo MTT, los ensayos MTS, INT, XTT y WST presentan la ventaja adicional de que el producto formazán formado es soluble en el medio de cultivo, lo cual evita la etapa de solubilización y disminuye el gasto de reactivos y el tiempo de análisis [397; 399-401].





### **III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



Falk et al. (1979) [83] fueron los primeros en advertir del riesgo que implica el manejo de fármacos citostáticos desde una perspectiva laboral. Estos autores demostraron, mediante la aplicación del test de fluctuación bacteriana, la presencia de sustancias mutagénicas en la orina de personal de enfermería encargado de la administración de los fármacos en comparación con la orina de controles (psicólogos y personal administrativo que no estaba en contacto con los citostáticos). A partir de estas observaciones, varios autores investigaron la posible exposición del personal laboral que manipula estos fármacos, así como los efectos asociados. Desde la década de los '90 hasta la actualidad se han desarrollado numerosos estudios para la determinación de marcadores de exposición a citostáticos por parte del personal laboral, fundamentalmente personal del servicio de farmacia y enfermeros/as del servicio de oncología encargados de la preparación o administración de los fármacos. Estos estudios se han realizado en diferentes países, incluyendo Holanda, Japón, Alemania, Italia, EE.UU., Canadá, Reino Unido, Suecia, Francia, España, Portugal, Perú o India [120; 126; 133; 178; 193; 197; 202; 205; 208; 210; 212-214; 220; 223; 225; 245; 283; 402]. En la gran mayoría de los trabajos publicados se describe la presencia de estos fármacos, en un porcentaje variable, en la orina de los trabajadores participantes en el estudio, si bien es cierto que algunos autores no detectaron ninguno de los citostáticos monitorizados [208; 210; 213; 228].

También se ha descrito la evaluación de la contaminación de las zonas de trabajo mediante el análisis de muestras de aire empleando bombas de muestreo [193; 220; 228], y muestras de superficies (CSB, bandejas y mesas de trabajo, suelos, etc) [133; 178; 208; 210; 212; 213; 220; 223; 224; 283] o de objetos presentes en la zona de trabajo (mascarillas, guantes, teléfonos, ordenadores, viales, bolsas I.V., etc) [80; 193; 205; 208; 234; 403]. Algunos autores como Villarini et al. (2011) [133] también evaluaron la exposición dérmica a 5-fluorouracilo y citarabina mediante el análisis de hisopos colocados en los antebrazos y pecho de los trabajadores durante la jornada laboral, con el objetivo de detectar la presencia de los compuestos debido a su depósito desde el ambiente, identificando la presencia de citostáticos en varios participantes.

Algunos autores han constatado la existencia de diferencias en el grado de exposición ocupacional en hospitales en los que se emplean distintas

medidas y sistemas de protección [214; 220; 223], así como la disminución de la exposición a lo largo de los años tras la implementación de mejoras en dichos sistemas [178; 222; 224; 228] y la existencia de campañas periódicas de monitorización [180; 287].

Sin embargo, la comparación de los resultados obtenidos por los distintos autores es difícil debido a diversas razones. En primer lugar, se ha producido un importante avance en cuanto a la sensibilidad y especificidad aportada por las técnicas analíticas disponibles para la determinación de los citostáticos entre los primeros estudios publicados en la década de los '90 hasta la actualidad, de manera que resultados negativos obtenidos con técnicas menos sofisticadas no implican la ausencia de riesgo. Además, existen también diferencias en las unidades utilizadas para describir la exposición a citostáticos en cada caso (ng/mL, ng/día, ng/orina, etc). Por otra parte, también se ha producido un progreso importante en cuanto a las medidas de seguridad y el uso de EPIs específicos por parte del personal expuesto a citostáticos, aunque siguen existiendo diferencias entre los distintos países e, incluso, en los diferentes hospitales dentro del mismo país [214; 220]. Por ello, la evaluación de la contaminación de las áreas de trabajo, así como la presencia de citostáticos en las muestras biológicas de los trabajadores, incluso en los trabajos más recientes [133; 223; 224; 228; 245; 287; 404], indican que, a pesar del importante avance en las últimas décadas en cuanto a las medidas de seguridad empleadas en el manejo de citostáticos, sigue existiendo riesgo de exposición a estos fármacos en la mayoría de los lugares de trabajo.

Esta preocupación afecta también a los profesionales españoles que trabajan en el ámbito de la oncología clínica pero, hasta la fecha, la situación del personal sanitario profesionalmente expuesto a citostáticos en nuestro país solo ha sido evaluada por Álvarez et al. (2012) [283]. Este trabajo puso de manifiesto la existencia de contaminación por 3 fármacos citostáticos en las superficies de trabajo de las zonas de preparación, validación y administración, con un alto porcentaje de muestras positivas. Sin embargo, no se abordó una posible exposición sistémica de los trabajadores a los citostáticos mediante el análisis de muestras biológicas de los mismos. Por tanto, se presupone que la exposición laboral de los profesionales sanitarios en España es similar a la de otros países de nuestro entorno y, a su vez, podría

estar influenciada por las medidas de protección individual utilizadas, así como el entrenamiento y experiencia profesional de cada trabajador.

De este modo, en la presente Tesis Doctoral se plantean una serie de objetivos con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre la exposición laboral a citostáticos de los profesionales que manipulan estos fármacos en nuestro entorno.

- Objetivos generales
- Estimar el nivel de exposición ocupacional a fármacos citostáticos en trabajadores implicados en su manejo o que puedan estar en contacto con estos compuestos.
- Identificar los factores de riesgo sobre los que se puede intervenir para minimizar la exposición.
- Evaluar el posible daño genotóxico producido por ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, etopósido y cisplatino “*in vitro*”.
- Objetivos específicos
- Desarrollar una metodología analítica basada en el uso de LC-MS/MS que permita detectar con la suficiente sensibilidad y especificidad los principales fármacos citostáticos utilizados en hospitales españoles para una identificación inequívoca a bajos niveles de concentración en muestras de superficies y orina (pg/cm<sup>2</sup> y pg/mL).
- Obtener y analizar muestras de diferentes superficies de trabajo del área de preparación y administración, y zonas anexas a las mismas, como medida de contaminación ambiental.
- Obtener y analizar muestras colocadas sobre la superficie corporal o la ropa de protección utilizada por los trabajadores como medida de exposición ambiental.
- Obtener y analizar muestras de orina de los trabajadores expuestos a fármacos citostáticos como medida de exposición biológica.
- Obtener y analizar muestras de orina de trabajadores no expuestos a fármacos citostáticos.
- Identificar los factores de riesgo ambientales evaluando la utilidad y eficacia de los sistemas y medidas de seguridad y protección utilizados.
- Identificar los factores de riesgo personales relacionados con las características del puesto de trabajo, así como la formación y experiencia del trabajador en el manejo de fármacos citostáticos.

- Evaluar el potencial efecto genotóxico de una selección de fármacos citostáticos (ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, etopósido y cisplatino) sobre una línea celular de monocitos humanos mediante la aplicación del ensayo cometa.



**IV. PARTE EXPERIMENTAL (1). DETERMINACIÓN DE  
FÁRMACOS CITOSTÁTICOS EN SUPERFICIES Y  
PARCHES DÉRMICOS MEDIANTE HPLC-MS/MS**



## **4.1. Material y métodos**

### **4.1.1. Instrumentación y material de laboratorio**

#### **4.1.1.1. LC-MS/MS**

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC Alliance HT Waters 2795 Separations Module (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos) compuesto de una bomba cuaternaria, un sistema desgasificador de membrana, un inyector automático con capacidad de refrigeración hasta 4°C y un sistema independiente de lavado de la aguja de inyección. El sistema cromatográfico consta de un horno de columna Waters Alliance Series Column Heater/Cooler.

El sistema de detección empleado consistió en un espectrómetro de masas en tándem Quattro Micro™ API ESCI de triple cuadrupolo (Waters Corporation).

Se utilizó el software MassLynx® V4.1 para el control del sistema HPLC-MS/MS y la adquisición de datos, y el software QuanLynx® V4.1 para el procesamiento de los datos (Waters Corporation).

#### **4.1.1.2. Instrumentación adicional**

- Baño evaporador termostatzado con suministro de nitrógeno TurboVap LV (Zymark, Hopkinton, MA, Estados Unidos)
- Centrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- Vórtex ZX3 (VELP Scientifica, Lombardía, MB, Italia)
- Agitador horizontal OVAN HS10-E (Suministros Grupo Esper S.L., Barcelona, España)
- Agitador magnético OVAN MBG50E (Suministros Grupo Esper S.L.)
- pH-metro Basic 20+ (Crison, Barcelona, España)
- Balanza analítica Sartorius LE244S (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Campana de extracción CRUMA 870 (Cruma, Barcelona, España)
- Cabina de seguridad biológica (CSB) clase II A (Azbil Telstar S.L., Barcelona, España)

- Sistema de purificación de agua Mili-Q (Millipore, Burlington, MA, Estados Unidos)

#### **4.1.1.3. Material de laboratorio**

##### **4.1.1.3.1. Material volumétrico**

- Pipetas automáticas Eppendorf de 20, 50, 100, 200, 1000, 5000 y 10000  $\mu$ L (Eppendorf)
- Probetas de 50, 100, 250 y 500 mL (Scharlab S.L., Barcelona, España)
- Matraces aforados de 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 y 2000 mL (Scharlab S.L.)
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (Scharlab S.L.)
- Frascos ISO transparentes de 500 y 1000 mL (Scharlab S.L.) (Duran Wheaton Kimble Life Sciences, Mainz, Alemania)

##### **4.1.1.3.2. Material fungible**

- Columna cromatográfica Atlantis T3 (100 x 2,1 mm, 3  $\mu$ m) (Waters Corporation)
- Botes de cristal ámbar de 1,5 mL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Botes de cristal ámbar de 8 mL (Chromacol, ThermoFisher Scientific)
- Tubos de ensayo de 5 mL de fondo redondo (12 x 75 mm) (Labbox Labware S.L., Barcelona, España)
- Viales de inyección (12 x 32 mm) con tapa pre-rajada "Screw Cap Lectra Bond PTFE/Silicone" (Waters Corporation)
- Insertos de 150  $\mu$ L para viales de inyección (Waters Corporation)
- Puntas de pipeta de 200, 1000, 5000 y 10000  $\mu$ L (Deltalab S.L., Barcelona, España)
- Tubos de poliestireno de 12 mL (15 x 102 mm), tapado, con faldón (Deltalab S.L.)

- Toallitas de precisión de laboratorio VWR Light-Duty Tissue Wipers 11,4 x 21 cm (VWR International, Radnor, PA, Estados Unidos)
- Filtros Filter Sampler® 16 mm x 4'' (POREX Filtration Group, POREX Corporation, Fairburn, Georgia, Estados Unidos)

#### **4.1.2. Disolventes y reactivos, sustancias patrón y disoluciones**

##### **4.1.2.1. Disolventes y reactivos**

- Metanol grado LC-MS (Fisher Scientific, Hampton, NH, Estados Unidos)
- Etanol (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España)
- Acetonitrilo (ACN) grado LC-MS (Scharlau, Barcelona, España)
- Ácido fórmico 98-100% (Scharlau)
- Amoníaco 32% (VWR Chemicals)
- Hidróxido sódico (Panreac)
- Agua Mili-Q (Milli-Q water System, Millipore, Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland)

##### **4.1.2.2. Sustancias patrón**

Todos los patrones de los compuestos citostáticos objeto de estudio, así como los correspondientes patrones internos (PI) deuterados, fueron obtenidos de Toronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, Ontario, Canadá), e incluyen las siguientes sustancias:

- Gemcitabina hidrocloreuro 10 mg (CAS: 122111-03-9)
- Dacarbazina 50 mg (CAS: 4342-03-4)
- Metotrexato 50 mg (CAS: 59-05-2)
- Irinotecán hidrocloreuro trihidrato 25 mg (CAS: 136572-09-3)
- Doxorubicinol 2.5 mg (CAS: 54193-28-1)
- Doxorubicina hidrocloreuro 5 mg (CAS: 25316-40-9)
- Epirubicina hidrocloreuro 5 mg (CAS: 56390-09-1)

- Ciclofosfamida monohidrato 1 g (CAS: 6055-19-2)
- Vinorelbina ditartrato 10 mg (CAS: 125317-39-7)
- Etopósido 50 mg (CAS: 33419-42-0)
- Docetaxel hidrato 5 mg (CAS: 700367-34-6)
- Paclitaxel 5 mg (CAS: 33069-62-4)
- Dacarbazina-d6 1 mg (CAS: 1185241-28-4)
- Metotrexato-d3 0,5 mg (CAS: 432545-63-6)
- Irinotecán-d10 hidrocloreuro 1 mg (CAS: 718612-62-5)
- Ciclofosfamida-d4 1 mg (CAS: 173547-45-0)
- Vinorelbina-d3 ditartrato 1 mg (CAS: no disponible)
- Etopósido-d3 1 mg (CAS: no disponible)
- Paclitaxel-d5 1 mg (CAS: 1129540-33-5)

#### **4.1.2.3. Disoluciones**

##### **4.1.2.3.1. Preparación de disoluciones madre de citostáticos**

Las disoluciones madre de los patrones puros adquiridos en estado sólido se prepararon directamente en los frascos comerciales añadiendo la menor cantidad de metanol que permitiese la completa disolución de los compuestos. En los casos en los que fue necesario emplear mayor volumen de disolvente que la capacidad del frasco, se trasvasó el volumen añadido al recipiente comercial a un frasco opaco de 8 mL, y se completó con la cantidad de disolvente necesaria para lograr su completa disolución. La concentración final de la disolución madre de cada compuesto fue de 1 mg/mL, excepto para metotrexato-d3, que se preparó a 0,5 mg/mL.

##### **4.1.2.3.2. Preparación de disoluciones de trabajo de citostáticos**

La preparación de los estándares de calibración o calibradores a partir de las disoluciones madre individuales se realizó elaborando inicialmente una disolución stock de trabajo en una mezcla de ácido fórmico 0,1% en agua:ACN (90:10, v/v) (disolución de reconstitución) conteniendo todos los

patrones a 10 µg/mL. A partir de esta disolución de stock se elaboraron disoluciones de trabajo a 2000, 1000, 400, 100, 40, 20, 4 y 2 ng/mL.

Para la elaboración de los controles de calidad (QC) se prepararon 2 disoluciones stock distintas (QC1 y QC2) a 10 µg/mL. La disolución stock QC1 incluye 10 compuestos (dacarbazina, metotrexato, irinotecán, doxorubicinol, doxorubicina, epirubicina, vinorelbina, etopósido, docetaxel y paclitaxel) y a partir de ella se elaboraron disoluciones de trabajo a 800 ng/mL, 240 ng/mL y 60 ng/mL para la preparación de muestras a QC alto, medio y bajo dentro del rango de calibración estudiado, respectivamente. La disolución stock QC2 incluye 2 compuestos (gemcitabina y ciclofosfamida) y a partir de ella se elaboraron disoluciones de trabajo a 800 ng/mL, 240 ng/mL y 6 ng/mL para la preparación de muestras a QC alto, medio y bajo, respectivamente.

Por otro lado, se preparó una disolución de stock conteniendo todos los patrones internos a una concentración de 10 µg/mL en disolución de reconstitución, mediante dilución de las disoluciones madre individuales. A partir de la disolución de stock se elaboró una disolución de trabajo de PI a 1 µg/mL.

#### **4.1.2.3.3. Preparación de disoluciones de optimización**

A partir de la disolución madre de cada compuesto se prepararon disoluciones de optimización individuales a 10 µg/mL en metanol, excepto para metotrexato, etopósido, docetaxel y paclitaxel que se utilizó disolución de reconstitución.

#### **4.1.3. Metodología analítica**

##### **4.1.3.1. Preparación de recta de calibrado y muestras QC**

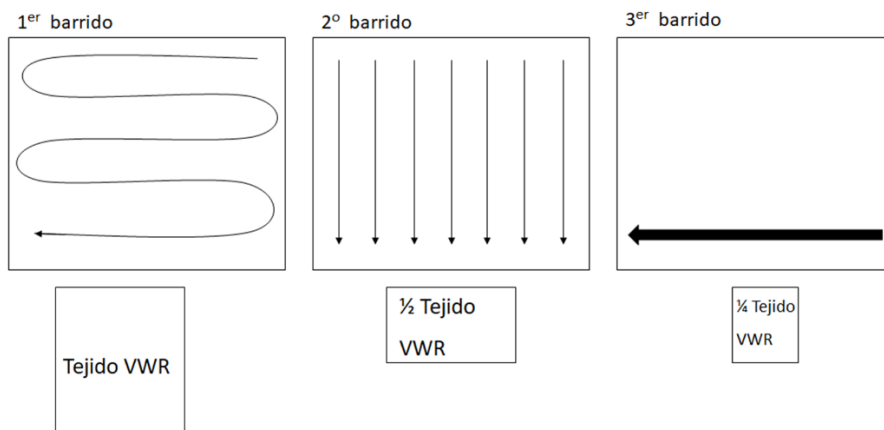
La preparación de calibradores y muestras QC se realizó empleando una placa de acero inoxidable. La placa se dividió en 18 cuadrados de 10 x 10 cm utilizando cinta de papel, cada uno de los cuales se utilizó para la preparación de una muestra. La recta de calibrado se preparó añadiendo 250 µL de la disolución de trabajo correspondiente para elaborar calibradores a 5, 10, 50, 100, 250, 1000, 2500 y 5000 pg/cm<sup>2</sup> sobre la placa de acero inoxidable. De la misma manera, para la elaboración de las muestras QC se añadieron 250 µL de las disoluciones de trabajo correspondientes para preparar muestras a QC bajo (15 o 150 pg/cm<sup>2</sup>, en función del compuesto), medio (600 pg/cm<sup>2</sup>) y alto

(2000 pg/cm<sup>2</sup>). Posteriormente, los analitos se recogieron humectando una toallita VWR con 500 µL de ácido fórmico 0,1% en agua:ACN (80:20, v/v) y realizando el barrido de cada sección dibujando, en primer lugar, un patrón en zig-zag horizontal y a continuación, tras plegar el tejido sobre sí mismo, mediante un barrido vertical hasta cubrir toda el área del cuadrado. La toallita se depositó en un tubo de recolección de poliestireno de 12 mL con faldón.

Tras cada uso de la placa de acero se procedió a su limpieza para evitar la acumulación continuada de los compuestos y evitar posible arrastre de contaminación, o *carry-over*, en las próximas pruebas. Se utilizó una sucesión de disoluciones formadas por A) ácido fórmico 2% en etanol, B) hidróxido sódico 0,3 M en etanol, C) agua Mili-Q y D) etanol. Se realizan 3 limpiezas con cada disolución utilizando papel humectado con cada una de ellas.

#### 4.1.3.2. Procedimiento de muestreo

Las muestras de superficies (10 x 10 cm) se recogieron utilizando un único tejido VWR humectado con 500 µL de disolución de muestreo (ácido fórmico 0,1%:ACN 80:20, v/v), realizando un barrido en diferentes direcciones y plegando el tejido con la superficies expuesta hacia el interior después de cada barrido (**Figura 1**). Tras la recogida de la muestra, el tejido se pliega de nuevo y se deposita en un tubo de recolección de poliestireno debidamente etiquetado.



**Figura 1:** Esquema del procedimiento de muestreo realizado para la toma de muestras de superficies.

#### 4.1.3.3. Procedimiento de extracción

La extracción de los analitos desde la toallita VWR se realizó dentro del propio tubo de recolección de muestra, al que se añadieron previamente 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de trabajo de PI a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y, a continuación, 4,5 mL de ácido fórmico 0,1% en agua:ACN (80:20, v/v) (disolución de extracción). Las muestras se sometieron a agitación horizontal durante 15 minutos a 400 rpm, tras lo cual se trasvasó el líquido a tubos de vidrio con ayuda de un filtro POREX. El disolvente se evaporó en un baño evaporador de nitrógeno termostatzado a 50°C. El extracto seco se reconstituyó en 100  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 0,1% en agua:ACN (90:10, v/v), se agitó en vórtex unos segundos, se centrifugó en inserto en MiniSpin 10 minutos a 14.500 rpm y se traspasó el inserto al vial de inyección para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ .

#### 4.1.3.4. Condiciones cromatográficas

El equipo utilizado consistió en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC Waters 2795 Separations Module. La separación cromatográfica se llevó a cabo en fase reversa empleando una columna Atlantis T3 (100 x 2,1 mm; 3  $\mu\text{m}$ ). Se utilizó una fase móvil binaria compuesta por ácido fórmico 0,1% en agua (A) y ACN (B). La separación se realizó en modo gradiente (**Tabla 4**) aplicando un flujo de 0,3 mL/min y manteniendo la columna termostatzada a 30°C, logrando así la separación de los 12 compuestos en un tiempo de 15 minutos. La columna fue equilibrada durante 5,5 minutos adicionales, dando lugar a un tiempo total de análisis de 20,5 minutos por muestra. El cambio de proporción de disolvente A y B a los porcentajes indicados a cada tiempo se realizó de forma progresiva.

**Tabla 4:** Método cromatográfico para la separación de 12 compuestos citostáticos en superficies y brazaletes.

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
1	95	5
6	74	26
9	74	26
10	60	40
11	30	70
12	0	100
15	0	100
15,5	95	5
20,5	95	5

#### 4.1.3.5. Condiciones de espectrometría de masas

La detección de los analitos se realizó mediante un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Micro™. El modo de ionización seleccionado fue electrospray en modo positivo (ESI+). La selección del ión pseudomolecular  $[M+H^+]$  o ión precursor en el primer cuadrupolo conduce a la fragmentación del mismo en la celda de colisión y permite seleccionar un fragmento procedente de esta molécula en el segundo cuadrupolo conocido como ión producto. La combinación de ión precursor-ión producto se conoce como transición. El modo de trabajo seleccionado se conoce como MRM. Se seleccionaron 2 transiciones para cada compuesto (la mayoritaria se empleó como cuantificadora, y la otra como cualificadora) y 1 transición para los patrones internos. El programa de adquisición de datos y cuantificación utilizado fue QuanLynx 4.1 (Waters Corporation).

La selección de las transiciones características para cada compuesto, así como los valores óptimos del espectrómetro de masas para su obtención, se realizó mediante la infusión de disoluciones de optimización individuales de cada uno de los citostáticos estudiados a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  y un flujo de 10  $\mu\text{L/min}$  utilizando una jeringa de infusión. Para ello se utilizó un sistema de infusión en "T" que combina el flujo procedente del cromatógrafo de líquidos (0,1% ácido fórmico:ACN 50:50 v/v, 0,15 mL/min) con la disolución de optimización del compuesto, y lo introduce en el espectrómetro de masas.

La optimización se realizó de forma automática, de manera que para cada compuesto se aplicaron rampas de voltajes de cono (VC) y de energías de colisión (EC), y el software selecciona los fragmentos más abundantes y los valores de VC y EC óptimos para cada uno de ellos. Finalmente, se eligieron los dos fragmentos más abundantes de cada compuesto que no produjesen interferencias. A excepción del VC y EC, los restantes parámetros del espectrómetro de masas no se pueden seleccionar de forma individual para cada compuesto. Por ello, en el caso del voltaje capilar se seleccionó aquel valor que produjo una mejor señal para la mayoría de los compuestos. La **Tabla 5** recoge los valores empleados para los parámetros generales del espectrómetro de masas.

**Tabla 5:** Valores seleccionados de los parámetros del espectrómetro de masas.

Parámetros de la fuente (ESI+)		Parámetros de los analizadores y de la celda de colisión	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Voltaje de capilar	4,5 kV	Low Mass Resolution 1	14,0
Voltaje de cono	Variable	High Mass Resolution 1	14,0
Voltaje del extractor	2 V	Ion Energy 1	0,5 V
Radiofrecuencia de las lentes	0,1 V	Voltaje entrada celda colisión	2 V
Tª de la fuente	150 °C	Voltaje salida celda de colisión	2 V
Tª del bloque	400 °C	Low Mass Resolution 2	14,0
Flujo de gas de desolvatación	500 L/h	High Mass Resolution 2	14,0
Flujo de gas de cono	50 L/h	Ion Energy 2	1 V
		Multiplicador	650 V
		Presión Argón en celda de colisión	1e <sup>-004</sup>

V: voltios; L/h: litros/hora

#### 4.1.4. Validación del método en superficies

La validación es una parte fundamental en el desarrollo de cualquier método analítico y comprende una serie de experimentos cuyo objetivo es garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de dicho método en la matriz objeto de estudio, así como su aplicabilidad en el uso y condiciones para las que ha sido desarrollado [405-410]. Los principales parámetros incluidos en la validación de un método analítico cuantitativo comprenden la selectividad, especificidad, linealidad/modelo de calibración, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación, efecto matriz, rendimiento de extracción y estabilidad. La validación del presente método se realizó siguiendo la guía de la Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) [405].

#### **4.1.4.1. Selectividad/Especificidad**

Los términos selectividad y especificidad suelen utilizarse indistintamente y describen la ausencia de respuesta de un método en presencia de otros compuestos distintos al analito.

La selectividad se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar y medir el compuesto de interés en presencia de otros componentes de la matriz que se espera que estén presentes en la muestra. También se conoce como selectividad endógena.

La especificidad se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar el analito de otros compuestos relacionados tales como productos de degradación, metabolitos, medicación concomitante y cualquier otra sustancia estructuralmente similar que pueda estar presente en la muestra. Este parámetro también se conoce como selectividad exógena.

#### **4.1.4.2. Modelo de calibración**

El modelo de calibración de un método analítico representa la relación entre la señal instrumental y concentraciones conocidas del analito. El rango de concentraciones de los calibradores debe elegirse teniendo en cuenta el rango de concentraciones que se espera encontrar en las muestras de estudio. La curva de calibración debe prepararse en la misma matriz biológica que las muestras de estudio. La curva de calibración se compone de una muestra blanco fortificada con PI y, al menos, 6 niveles de concentración diferentes cubriendo todo el rango de calibración. El modelo de calibración empleado será el modelo más simple que describa una adecuada relación concentración-respuesta, con un coeficiente de variación mayor de 0,99 y residuales  $\pm 20\%$  de la concentración nominal o teórica.

#### **4.1.4.3. Límite de detección**

El límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad o concentración de analito en una muestra que puede ser identificada de forma fiable por el método analítico. Los criterios para su selección incluyen la identificación de las dos transiciones seleccionadas en el tiempo de retención medio obtenido en los calibradores ( $\pm 0,2$  min) y una relación señal/ruido (S/N)  $> 3$ .

Además, para garantizar la detección e identificación inequívoca de un compuesto debe tenerse en cuenta la relación entre la intensidad relativa de las 2 transiciones seleccionadas para cada compuesto (conocida como *ión ratio* o razón de iones) como criterio adicional al tiempo de retención y a la relación S/N >3. El *ión ratio* se determina dividiendo el área del pico de la transición cuantificadora entre el área del pico de la transición cualificadora. La Directiva del Consejo 96/23/EC [411] establece unas tolerancias máximas permitidas para la intensidad relativa de los iones en función de la técnica utilizada. Dado que el análisis instrumental se basa en la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem, los valores permitidos aparecen recogidos en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Tolerancia máxima permitida en el *ión ratio* en función de la intensidad relativa de los iones.

Intensidad relativa (% pico base)	Tolerancia permitida (%)
> 50 %	±20 %
> 20 % - 50 %	±25 %
> 10 % - 20 %	±30 %
< 10 %	±50 %

#### 4.1.4.4. Límite de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se define como la menor cantidad o concentración de analito que puede ser cuantificada con adecuada precisión y exactitud. El límite superior de cuantificación (ULOQ) se corresponde con el calibrador más alto de la curva de calibración.

#### 4.1.4.5. Exactitud y Precisión

La exactitud de un método analítico describe la concordancia entre el valor medio obtenido con la metodología y el valor teórico. Se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{valor medio}}{\text{valor teórico}} \times 100$$

También puede expresarse como porcentaje de inexactitud mediante el uso de un parámetro conocido como error relativo medio (MRE), que se calcula con la siguiente fórmula:

$$MRE = \frac{(\text{media de los resultados obtenidos} - \text{concentración teórica})}{\text{concentración teórica}} \times 100$$

La precisión de un método analítico hace referencia a la proximidad de los resultados entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestras a la misma concentración. La precisión se expresa como porcentaje del coeficiente de variación (%CV) o desviación estándar relativa (RSD), y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Coeficiente de variación (\%CV)} = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{valor medio}} \times 100$$

Asimismo, se establecen 2 tipos de precisión, la precisión intra-día o repetibilidad (que evalúa la precisión de las muestras analizadas en condiciones similares: dentro del mismo "run" analítico, por los mismos operadores, etc), y la precisión inter-día, precisión intermedia o reproducibilidad (que evalúa la precisión bajo distintas condiciones: diferentes días, distintos analistas, equipos y reactivos, etc).

El estudio de la exactitud y precisión se realizó a 3 niveles de concentración (QC bajo, QC medio y QC alto correspondientes a las concentraciones de 15/150, 600 y 2000 pg/cm<sup>2</sup>, respectivamente) por triplicado en 5 días diferentes.

#### 4.1.4.6. Efecto matriz

El empleo de LC-MS/MS puede conducir a un fenómeno conocido como efecto matriz, que se caracteriza por la supresión o aumento de la señal del analito debido a la presencia de otros compuestos co-eluyentes procedentes de la muestra o de la fase móvil que compiten con el analito en el proceso de ionización. La determinación del efecto matriz se llevó a cabo a 2 niveles de concentración (QC bajo y QC alto) mediante la metodología de adición post-extracción utilizando 4 replicados por concentración. Esta metodología consiste en la preparación de dos series distintas de muestras y la comparación de la señal del analito obtenida en cada una de ellas. Por un lado, una serie compuesta por muestras fortificadas directamente en el

disolvente de reconstitución (muestras “*neat*”), y por otro lado, muestras fortificadas sobre el extracto seco tras la extracción de la matriz sin analito.

#### **4.1.4.7. Rendimiento de extracción y eficiencia del proceso**

El rendimiento de extracción o recuperación es el porcentaje de analito que se recupera tras haber realizado el proceso de extracción de la muestra.

La eficiencia del proceso no solo tiene en cuenta la recuperación sino que también considera el efecto matriz como parte integral del proceso analítico al que se somete la muestra.

Estos parámetros se calcularon utilizando muestras QC a baja y alta concentración (QC bajo y QC alto). El rendimiento de extracción se determinó mediante la comparación de muestras QC fortificadas antes y después de la extracción. La eficiencia del proceso se determinó mediante la comparación del área del analito en muestras QC fortificadas antes de la extracción con el área del analito en muestras “*neat*”. Se realizaron 4 replicados para cada concentración y procedimiento debido a la limitación de espacio en la placa de acero inoxidable.

#### **4.1.4.8. Estabilidad**

La SWGTOX define la estabilidad como la resistencia de un analito a cualquier cambio químico en una matriz bajo condiciones específicas y durante un determinado intervalo de tiempo. La evaluación de la estabilidad deberá llevarse a cabo de forma que se garantice que cualquier etapa realizada durante la preparación y análisis de la muestra, incluido las condiciones de almacenamiento, no afectan a la concentración del analito. Por tanto, la evaluación de la estabilidad de los analitos dependerá de las circunstancias que acompañan al procesado y análisis de las muestras, es decir, si la muestra será analizada directamente o deberá ser almacenada antes de su posterior manipulación, o su conservación una vez haya sido procesada por la imposibilidad de analizarla debido a problemas técnicos. Para ello, se realizarán una serie de pruebas teniendo en cuenta todas estas circunstancias. Así, puede ser necesario evaluar la estabilidad en-proceso, estabilidad de la muestra en el muestreador (“*autosampler*”), estabilidad a corto plazo, estabilidad a medio/largo plazo, estabilidad después de la congelación/descongelación de la muestra (“*F/T*”, por sus siglas en inglés). La evaluación de este parámetro en la metodología de superficies y brazaletes

consistió en la determinación de la estabilidad de la muestra procesada a corto plazo tras 3 días en el “*autosampler*” a 6°C, y la estabilidad a largo plazo de la muestra sin procesar tras 2 meses en congelador a -22°C.

Se realizaron pruebas de estabilidad para cada una de las condiciones indicadas a 2 niveles de concentración (QC bajo y QC alto) por triplicado, excepto para estabilidad en el “*autosampler*”, que también se realizó a QC medio.

En la **Tabla 7** se resumen los parámetros estudiados, los experimentos realizados para cada uno de ellos, y los criterios de aceptación adoptados para obtener una validación satisfactoria de acuerdo con la guía de la SWGTOX.

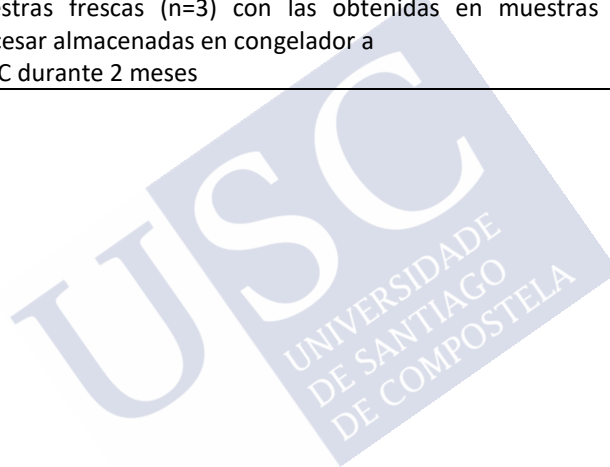


**Tabla 7:** Parámetros de validación evaluados, experimentos realizados y criterios de aceptación.

Parámetro	Experimento	Criterio de aceptación
Selectividad	Muestras blanco fortificadas con patrón interno	Ausencia de interferencias
Especificidad	Muestras fortificadas con distintos fármacos y drogas de abuso	Ausencia de interferencias
Linealidad	5 curvas de calibración elaboradas en días diferentes (n=5) 6-8 niveles de calibración (5 niveles para VBN)	$r^2 \geq 0,99$ Residual $\pm 20\%$
Límite de detección (LOD)	Muestras fortificadas al LOD evaluado (n=3) en 3 días distintos (n=9)	Detección de las 2 transiciones Relación S/N >3 Lón ratio adecuado* $T_R \pm 0,2$ min con respecto al de calibradores
Límite de cuantificación (LOQ)	Muestras fortificadas al LOQ evaluado (n=3) en 3 días distintos (n=9)	%CV $\leq 20\%$ y MRE $\pm 20\%$
Exactitud y Precisión	Muestras fortificadas a QC bajo, medio y alto (n=3 para cada concentración) en 5 días diferentes (n=15)	%CV $\leq 20\%$ y MRE $\pm 20\%$
Efecto matriz	Muestras a QC bajo y alto comparando el área del pico del analito en muestras fortificadas tras la extracción (n=4) con el área del pico del analito en muestras preparadas en el disolvente de reconstitución ("neat") (n=4)	-
Rendimiento de extracción	Muestras a QC bajo y alto comparando el área del pico del analito en muestras fortificadas antes de la extracción (n=4) con muestras fortificadas tras la extracción (n=4)	-
Eficiencia del proceso	Muestras a QC bajo y alto comparando el área del pico del analito en muestras fortificadas antes de la extracción (n=4) con muestras preparadas en el disolvente de reconstitución (n=4)	-

<b>Parámetro</b>	<b>Experimento</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Estabilidad a corto plazo en el "autosampler"	Muestras a QC bajo, medio y alto comparando las concentraciones en muestras frescas (n=3) con las obtenidas en muestras procesadas y conservadas durante 72 horas en el "autosampler" a 6°C	QCs ±20% comparados con muestras QC frescas
Estabilidad a largo plazo	Muestras a QC bajo y alto comparando las concentraciones en muestras frescas (n=3) con las obtenidas en muestras sin procesar almacenadas en congelador a -22°C durante 2 meses	QCs ±20% comparados con muestras QC frescas

\*Directiva del Consejo 96/23/EC [411]



#### 4.1.5. Validación del método en brazaletes

La validación del método para la determinación de los analitos objeto de estudio en los brazaletes colocados en los antebrazos de los trabajadores consistió en la preparación de una recta de calibrado en la placa de acero inoxidable, realizando la toma de muestra de los calibradores con tejidos VWR nuevos, que se utilizó para cuantificar muestras a QC bajo y QC alto (n=3 para cada concentración) preparadas sobre la placa de acero pero realizando la toma de muestra de estos QCs con tejidos VWR previamente expuestos al ambiente durante un período mayor de 8 horas para simular la jornada laboral de los trabajadores y comprobar si la exposición al ambiente afecta a la capacidad del tejido para recoger los compuestos y/o al efecto matriz observado.

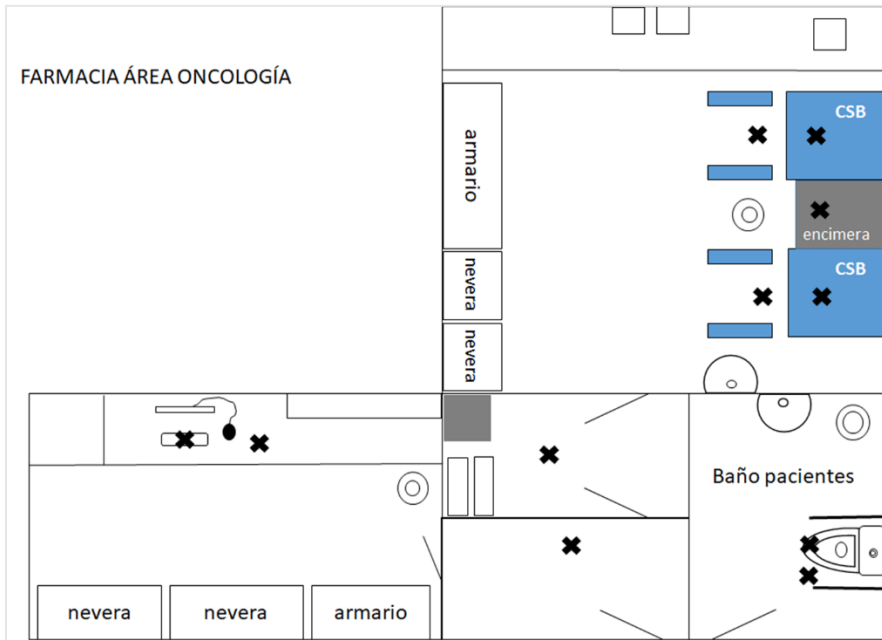
#### 4.1.6. Aplicación a muestras reales

Tras la validación, se aplicó el método a muestras tomadas en distintas superficies de trabajo y otras zonas del Servicio de Farmacia y del Servicio de Oncología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, así como a brazaletes colocados sobre la piel del personal sanitario voluntario implicado en la preparación o administración de estos fármacos, personal administrativo y personal de limpieza, durante su turno de trabajo.

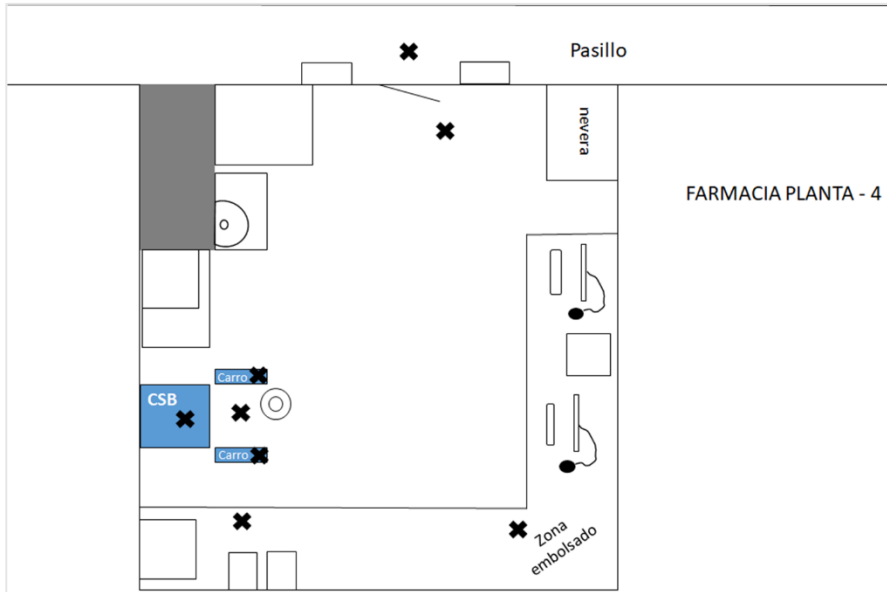
En un primer contacto con el Jefe del Servicio de Farmacia y del Servicio de Oncología se informó del objetivo del estudio y se recabó información acerca de los fármacos citostáticos más utilizados, y los sistemas y medidas de seguridad colectivos. La información suministrada fue transmitida a los responsables de cada zona de trabajo. Posteriormente, 2 semanas antes del inicio de la recogida de muestras, se informó al personal en contacto con fármacos citostáticos acerca de las características del estudio (objetivos, metodología y cronograma). Al personal que estuvo de acuerdo con su inclusión en el estudio se le entregó la hoja de información (**Anexo 1**), donde se explica con más detalle la finalidad del estudio y las implicaciones y riesgos de la participación, y el documento de consentimiento informado (**Anexo 2**). También se hizo entrega de un cuestionario (**Anexo 3**) a cada trabajador donde se recoge información demográfica y profesional, así como información relativa al grado de exposición (tipo y cantidad de citostáticos manejados) y medidas de protección individual utilizadas. Este estudio ha

sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G) (**Anexo 4**).

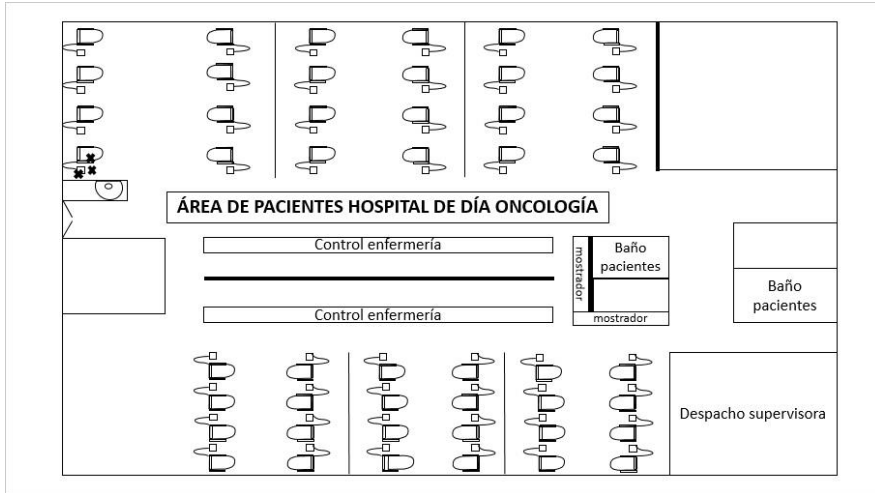
La preparación de formulaciones intravenosas se distribuye entre 2 áreas: el Área de Farmacia y el Área de Oncología-Hematología. El Servicio de Farmacia del Área de Farmacia se compone de dos salas, una de ellas integrada con dos cabinas de flujo horizontal para la elaboración de formulaciones parenterales estériles, y otra, formada por una cabina de seguridad biológica de clase II tipo A (CSB-1), para la elaboración de formulaciones parenterales antineoplásicas estériles. Por otro lado, en el Área de Oncología-Hematología también disponen de un Servicio de Farmacia para la elaboración y dispensación de formulaciones antineoplásicas intravenosas y orales. En esta zona, las formulaciones intravenosas se elaboran en una sala compuesta por una CSB de clase II tipo A y una CSB de clase II tipo B (CSB-2 y CSB-3), mientras que las fórmulas orales se dispensan en las consultas de farmacia del Área de Oncología y del Área de Hematología por farmacéuticos o auxiliares de farmacia. Las **Figuras 2, 3 y 4** representan la distribución de las distintas áreas y servicios mencionados.



**Figura 2:** Esquema representativo de la distribución del Servicio de Farmacia ubicado en el Área de Oncología. Los puntos marcados con una "X" indican los sitios de muestreo.



**Figura 3:** Esquema representativo de la distribución del Servicio de Farmacia ubicado en el Área de Farmacia. Los puntos marcados con una "X" indican los sitios de muestreo.



**Figura 4:** Esquema representativo de la distribución del Área de pacientes del Hospital de Día de Oncología. Los puntos marcados con una "X" indican los sitios de muestreo.

Las muestras de superficies fueron recogidas personalmente en los Servicios de Farmacia y Oncología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, antes y/o después del turno de trabajo, en función de la ubicación de la superficie a muestrear. Se muestrearon diferentes zonas dentro de cada área del hospital. Así, en el Servicio de Farmacia del Área de Farmacia se recogieron muestras de las superficies de trabajo de las CSB, suelos (enfrente de las CSB, en la entrada de la sala, en el pasillo exterior y en el vestuario), carros, encimeras y bolígrafos. En el Servicio de Farmacia del Área de Oncología se muestrearon CSB, suelos (enfrente de las CSB, en la antesala y en la sala exterior), carros, encimeras, cajetines, viales, contenedores, bolsas de infusión, blísteres de medicamentos citostáticos, entrada de los filtros HEPA, mesa de documentación y teclado y ratón del ordenador. En el Hospital de Día del Área de Onco-Hematología se tomaron muestras de la superficie de bombas de perfusión, sillones, suelos debajo de las bombas, baños de pacientes y contenedores de residuos. Las muestras recogidas para evaluar la contaminación de viales se tomaron mediante el muestreo de 4 viales diferentes del mismo compuesto utilizando el mismo tejido de muestreo.

La toma de muestras reales de las superficies de trabajo se realizó delimitando el área seleccionada empleando un marco de papel adhesivo con una superficie interna de 10 x 10 cm, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de calibradores y muestras QC descrito en el apartado 4.1.3.2. (**Figura 1**). Así, las muestras se recogieron humectando una toallita VWR con 500 µL de ácido fórmico 0,1%:ACN (80:20, v/v) y realizando el barrido de cada zona dibujando, en primer lugar, un patrón en zig-zag, a continuación, tras plegar el tejido sobre sí mismo, mediante un barrido vertical hasta cubrir toda el área del cuadrado y, finalmente, tras plegar de nuevo el tejido, mediante un barrido horizontal. Las toallitas se depositaron en tubos de recolección de poliestireno de 12 mL convenientemente etiquetados. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Toxicología donde se almacenaron a -22°C hasta su análisis.

La toma de muestras con brazaletes se realizó mediante la colocación de las toallitas VWR por los participantes alrededor de los antebrazos mediante un brazalete elástico durante todo el turno de trabajo. El brazalete elástico lleva incorporada la toallita VWR (10 x 7 cm) con la zona de exposición hacia el ambiente con el objetivo de evaluar el depósito de fármacos citostáticos en la cara externa del tejido que no está en contacto directo con la piel o la ropa. Al finalizar la jornada laboral, los participantes depositaron el brazalete con la toallita en un sobre de plástico con cierre hermético, debidamente etiquetado, plegando el brazalete sobre sí mismo con la toallita hacia el interior. Posteriormente, en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), se retiró la toallita del brazalete, se depositó en frascos de poliestireno de 12 mL y se almacenó a -22°C hasta su análisis.

## **4.2. Resultados y Discusión**

### **4.2.1. Procedimiento de muestreo y extracción**

Las condiciones seleccionadas son las descritas en el apartado 4.1.3.3. Sin embargo, previamente al proceso de extracción, fue necesaria la elección del material con el cual se realizaría el muestreo de las superficies de trabajo y que se utilizaría también para elaborar los brazaletes que se colocarán en los antebrazos de los trabajadores. Se evaluaron distintos tipos de tejidos fabricados con diferentes materiales y con distintos tamaños:

- VWR Light-Duty Tissue Wipers 11,4 x 21 cm (VWR International)
- Compresas estériles de tejido sin tejer 10 x 10 cm (Acofarma distribución S.A., Madrid, España)
- Apósito estéril de tejido sin tejer 7,5 x 7,5 cm (Indas, Madrid, España)
- Papel de filtro Whatman no. 42, 110 cm de diámetro (GE: Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido)
- Algodón recolector del dispositivo Salivette® (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Alemania)

Estos tejidos fueron fortificados con 100 ng de cada uno de los compuestos, así como de los correspondientes PI, y se realizó la extracción con disolvente (5 mL de ácido fórmico 0,1%:ACN, 80:20, v/v) para determinar el tejido que proporcionaba una mayor recuperación. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El tejido VWR fue el que proporcionó una mayor señal para los analitos objeto de estudio.

A continuación, se evaluaron distintos frascos recolectores para depositar el tejido una vez realizado el muestreo:

- Tubos de poliestireno de 12 mL (15 x 102 mm), tapado, con faldón (Deltalab S.L.)
- Tubos de polipropileno de 30 mL (25 x 90 mm), tapado, con faldón (Deltalab S.L.)
- Tubos de orina de polietileno de 50 mL (38 x 70 mm) (Deltalab S.L.)

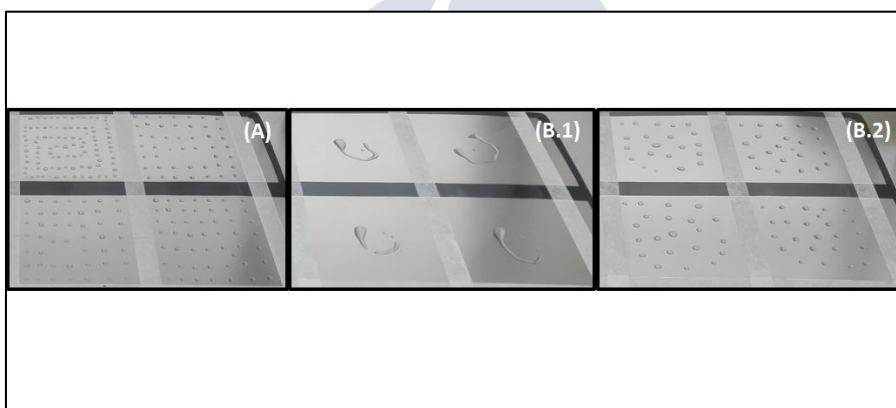
Se seleccionaron finalmente los tubos de poliestireno de 12 mL ya que permitieron una mayor facilidad para realizar la extracción de las muestras. En cuanto al disolvente de extracción, se probaron distintas mezclas de disolventes en diferentes proporciones [ácido fórmico 0,1% en agua, ácido fórmico 0,1% en agua:ACN en distintas proporciones (80:20, 50:50, 30:70, 20:80, v/v), ácido fórmico 0,1% en agua:ACN:metanol (65:25:10 y 65:10:25, v/v), acetato amónico (pH 6,68, pH 4 y pH 2):ACN:metanol (65:25:10, v/v) y acetato amónico pH 2:ACN (50:50, v/v)]. La mezcla que proporcionó mejores resultados fue ácido fórmico 0,1% en agua:ACN (80:20, v/v). Se evaluaron también distintos volúmenes de disolvente de extracción (3, 5 y 8 mL), distintos procedimientos de agitación (agitación horizontal, sonicación y rotación), el uso de un dispositivo de filtrado para la recuperación del disolvente de extracción (POREX Filter Sampler® 16 mm x 4 ``), distintos filtros de jeringa para el filtrado de las muestras tras su reconstitución antes

de trasvasarlas al vial de inyección (filtro Aerodisc GHP 13 0,45  $\mu\text{m}$ ; filtro hidrofílico PTFE 13 mm 0,22  $\mu\text{m}$ ; filtro PTFE MS 4 mm 0,22  $\mu\text{m}$ ; y filtro hidrofóbico PTFE MS 4 mm 0,22  $\mu\text{m}$ ), distintas temperaturas del baño evaporador de nitrógeno (entre 40 y 60°C) con y sin adición de ácido clorhídrico 1%, y el disolvente de reconstitución (ácido fórmico 0,1% en agua:ACN 95:5 y 90:10 (v/v), tanto en mezcla como de forma secuencial). Todas las pruebas se realizaron por triplicado fortificando las muestras con 100 ng de cada compuesto, sometiénolas a las condiciones a evaluar y comparando la señal analítica obtenida en cada caso.

Las condiciones seleccionadas fueron las que figuran en el apartado 4.1.3.3. Brevemente, el frasco con el tejido VWR junto con 4,5 mL de disolvente de extracción (ácido fórmico 0,1%:ACN 80:20, v/v) se sometió a agitación vertical durante 15 minutos a 400 rpm. La recuperación del disolvente contenido en el tubo de recolección y en el tejido VWR se realizó empleando un filtro POREX, el cual no retiene los compuestos de interés. El líquido se evaporó a sequedad en un baño evaporador de nitrógeno termostatzado a 50°C. El extracto seco se reconstituyó en 100  $\mu\text{L}$  de mezcla ácido fórmico 0,1% en agua:ACN (90:10, v/v), ya que permite una mejor solubilización de los compuestos. Los filtros de jeringa evaluados para eliminar el posible paso de partículas a los viales de inyección una vez reconstituida la muestra fueron de difícil manejo y, además, produjeron la retención total de 2 compuestos (docetaxel y paclitaxel). Por ello, se descartó su uso y se procedió a la centrifugación del inserto en centrífuga MiniSpin a 14.500 rpm durante 10 minutos.

La optimización del método de muestreo se realizó fortificando previamente la placa de acero inoxidable con los analitos de interés a 2.500  $\text{pg}/\text{cm}^2$  y, posteriormente, se evaluó el uso de distintos volúmenes de disolvente de muestreo (100, 250 y 500  $\mu\text{L}$ ), y distintos procedimientos de limpieza (barrido horizontal, barrido horizontal + vertical, barrido en zig-zag). El protocolo final de muestreo se realizó humectando el tejido VWR con 500  $\mu\text{L}$  de disolvente de extracción (ácido fórmico 0,1% en agua:ACN, 80:20, v/v) y realizando la limpieza de la superficie primero mediante un barrido en zig-zag, a continuación, con el mismo tejido tras ser plegado sobre sí mismo, con un barrido vertical hasta cubrir toda el área y, finalmente, con un barrido horizontal. Se realiza esta combinación ya que el objetivo es recuperar la mayor cantidad posible de los analitos. Asimismo, también se

optimizó el proceso de fortificación de los distintos segmentos de la placa de acero inoxidable para lograr una distribución homogénea y reproducible de los compuestos por toda la superficie. La fortificación de los segmentos, tanto para las pruebas de muestreo como para la preparación de calibradores y muestras QC, se realizó añadiendo  $125\ \mu\text{L} + 125\ \mu\text{L}$  de la disolución correspondiente utilizando una pipeta automática de  $200\ \mu\text{L}$  para lograr un menor tamaño de gota y disponer de suficientes gotas para realizar una dispersión homogénea por toda la superficie del segmento. A diferencia de esta técnica, la fortificación directa con  $250\ \mu\text{L}$  de disolución utilizando una pipeta de  $1000\ \mu\text{L}$  conducía a un mayor tamaño de gota, dando lugar a una dispersión irregular por la placa. La **Figura 5** muestra la dispersión homogénea de las gotas mediante la técnica de doble adición de la disolución (A), a diferencia de la dispersión irregular obtenida al añadir directamente los  $250\ \mu\text{L}$  de disolución (B).



**Figura 5:** Fortificación de los segmentos de la placa de acero inoxidable añadiendo  $2 \times 125\ \mu\text{L}$  de disolución con pipeta de  $200\ \mu\text{L}$  (A), o bien añadiendo  $250\ \mu\text{L}$  directamente a chorro (B.1) o mediante gotas (B.2).

Finalmente, tras cada serie de pruebas realizadas en la placa de acero se procedió a la limpieza de la misma para evitar la acumulación continuada de los compuestos y evitar un posible *carry-over*, por lo que fue necesario optimizar el procedimiento de limpieza. Se evaluaron distintas disoluciones (ácido fórmico 2% en etanol, hidróxido sódico 0,3 M en etanol, agua y etanol) pero dado que ninguna de ellas por sí sola consiguió eliminar todos los compuestos, fue necesario realizar la limpieza con todas ellas. Se realizaron

3 limpiezas con cada disolución utilizando papel humectado con cada una de ellas.

La metodología de muestreo y extracción de los compuestos citostáticos varía ampliamente entre los distintos trabajos publicados. En primer lugar, el área estándar muestreada cambia significativamente, desde los 30 cm<sup>2</sup> [248] o 50 cm<sup>2</sup> [241] hasta los 8500 cm<sup>2</sup> [192]. Asimismo, en algunos trabajos la superficie muestreada se mantiene constante independientemente de la zona muestreada [131; 178; 221; 285; 412], mientras que en otros depende del sitio de muestreo [133; 217; 218; 234; 258; 269; 282; 286; 292].

En relación con la técnica de muestreo, la mayoría de los trabajos realizan la limpieza de la superficie usando un material impregnado con el disolvente de muestreo [71; 72; 120; 131-133; 174; 177; 198; 210; 213; 219; 221; 232; 234; 236; 237; 240; 241; 244-246; 254-257; 261; 268; 271; 274; 284; 285; 292; 293; 412-414], mientras que otros aplican el disolvente directamente en la superficie y, a continuación, realizan la limpieza de la misma [203; 209; 212; 217; 218; 220; 224; 225; 258; 275; 282; 286; 415]. Algunos autores como Maeda & Miwa (2013) [244] aplican incluso la disolución de PI en la superficie de muestreo. Sin embargo, esta práctica fue descartada en el trabajo descrito en el presente documento debido a la imposibilidad de aplicarla en condiciones reales de muestreo en ambientes hospitalarios, ya que se estaría realizando una contaminación intencionada de las superficies. Por otro lado, la práctica más habitual fue el uso de un solo tejido para realizar el muestreo [120; 133; 177; 219; 243; 246; 247; 255; 270; 271], aunque también ha sido frecuente el empleo de 2 tejidos [73; 75; 207; 210; 212; 213; 220; 224; 254; 258; 274; 282], 3 tejidos [72; 234; 238; 290; 292; 295; 414; 416; 417], e incluso hasta 4 y 5 tejidos diferentes por cada muestra [178; 192; 198; 201; 221; 257], o también la realización de varias limpiezas con un solo tejido [71; 174; 246; 256; 293; 403; 412], práctica también empleada en la metodología descrita en este capítulo.

Por otro lado, el material de la superficie a muestrear también juega un papel importante en la eficiencia de recuperación de los compuestos. Así, algunos autores han evaluado distintos tipos de material representativo de las superficies reales de trabajo tales como acero inoxidable (CSB), vidrio (CSB y neveras), formica (mostradores y encimeras), vinilo y PVC (suelos), y otras resinas (melamina) y plásticos. Aunque los resultados obtenidos varían en función del compuesto, por lo general, las superficies lisas no porosas

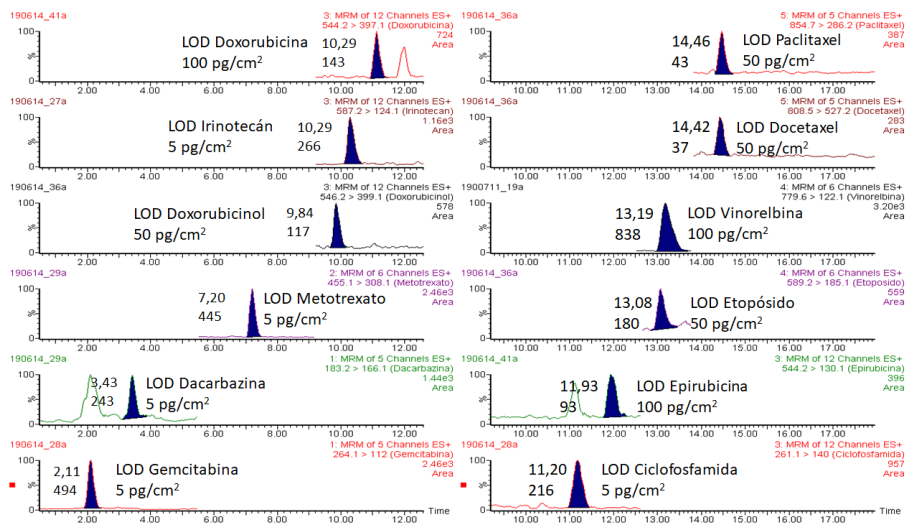
como acero, vidrio, formica y otros laminados permiten una mayor recuperación, mientras que las superficies porosas como vinilo, PVC y otros plásticos proporcionan un menor rendimiento de muestreo, lo que infravaloraría los niveles detectados [212; 274; 285; 414; 415; 418]. Además, los compuestos pueden difundir hacia el interior de los poros, disminuyendo la eficacia de los procedimientos de limpieza, y acumularse durante el tiempo, provocando una contaminación continuada al liberarse de nuevo a la superficie o el ambiente. Así, algunos autores han constatado los mayores niveles de contaminación en las superficies con los materiales más porosos [246; 255; 284].

El procedimiento de extracción más sencillo y seguido por la mayoría de los autores consistió en la extracción con disolvente, el cual en muchos casos era el mismo que el utilizado en la etapa de muestreo [71; 78; 133; 193; 201; 213; 232; 240; 244; 255; 270; 285; 286; 290; 412; 413; 415; 417], mientras que en otros casos se usó distinto disolvente para la etapa de muestreo y la de extracción [131; 203; 245; 256; 271; 274; 416]. Sin embargo, también se han descrito técnicas de extracción adicionales a la extracción con disolventes tales como la extracción en fase sólida [213; 296; 412; 419] y la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos como acetato de etilo [176; 192; 193; 198; 203; 261; 274; 278], dietiléter [271] o metanol [278]. Estos procedimientos se utilizaron para extraer principalmente ciclofosfamida e ifosfamida, aunque también se aplicó a metotrexato, 5-fluorouracilo y compuestos de platino.

Finalmente, en algunos de los trabajos publicados en los que monitorizan paclitaxel y/o docetaxel, se realiza una etapa de filtrado con filtros de jeringa de tamaño de poro entre 0,2 y 0,45  $\mu\text{m}$  [131; 177; 232; 245; 290; 413-415; 418], mientras que en la metodología descrita en este capítulo ambos compuestos quedaron totalmente retenidos al aplicar dicho procedimiento de filtración. De este modo, Colombo et al. (2017) [293] han sustituido esta etapa de filtrado por la centrifugación debido a la adsorción de alguno de los compuestos citostáticos monitorizados a alguno de los 3 filtros evaluados, comprometiendo la eficiencia de desorción.

#### 4.2.2. Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica de los 12 compuestos citostáticos objeto de estudio en muestras de superficies y brazaletes se llevó a cabo con una columna Atlantis® T3 (100 x 2,1 mm; 3 µm), la cual permitió la retención de moléculas polares y apolares. Se utilizó como fase móvil una mezcla binaria formada por ácido fórmico 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B) a un flujo constante de 0,3 mL/min. Con las condiciones aplicadas, la elución de todos los compuestos se produjo en 15 minutos y el tiempo total de análisis fue de 20,5 minutos. La **Figura 6** muestra los cromatogramas de las transiciones cuantitativas para cada compuesto al LOQ.



**Figura 6:** Cromatograma de los compuestos citostáticos en muestras de superficies al LOD.

Otras columnas cromatográficas (**Tabla 8**) fueron también evaluadas, aunque los resultados no fueron plenamente satisfactorios. La columna Kinetex C18 fue descartada debido a que no permitía una separación adecuada de todos los compuestos. Las columnas Atlantis® T3 y XBridge™ Shield RP18 dieron resultados similares, aunque la sensibilidad para algunos de los compuestos (vinorelbina y paclitaxel) se duplicaba con la columna Atlantis® T3, por lo que fue la columna de elección. Como fase móvil, con cada una de las columnas analíticas mencionadas se evaluaron distintas fases

acuosas (ácido fórmico 0,1% en agua, formiato amónico 2 mM pH 3 en agua, y acetato amónico 10 mM pH 6,8 y pH 4,5 en agua) y orgánicas (metanol, ACN o 0,1% de ácido fórmico en ACN). El uso de ACN como componente orgánico proporcionó mejores resultados que el metanol, ya que este último aumentaba los tiempos de retención de los compuestos más apolares, haciendo difícil la monitorización de no más de 18 transiciones simultáneamente (incluyendo las 2 transiciones de cada compuesto y 1 transición del correspondiente PI), condición necesaria para poder describir el área del pico de cada sustancia con suficientes puntos de adquisición para obtener una respuesta reproducible con el espectrómetro de masas empleado en esta metodología. Además, la intensidad de señal de algunos compuestos (vinorelbina y paclitaxel) fue superior con ACN que cuando se utilizó la mezcla de ácido fórmico 0,1% en ACN. Como fase acuosa, el ácido fórmico 0,1% en agua proporcionó una mayor sensibilidad y forma de pico para los compuestos con respecto a las otras disoluciones evaluadas.

**Tabla 8:** Distintas columnas analíticas evaluadas para la separación cromatográfica.

Columna	Relleno	Longitud x ID (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Tamaño de poro (Å)
Kinetex C18	Core-Shell Silica, C18 with TMS endcapping	50 x 2,1	2,6	100
Atlantis® T3	Difunctionally bonded, silica-based, reversed-phase C18	100 x 2,1	3	100
XBridge™ Shield RP18	Embedded carbamate group in the bonded phase	100 x 2,1	3,5	130

ID: internal diameter

Numerosos trabajos han descrito métodos para la determinación de compuestos citostáticos en distintas superficies del área de trabajo, tales como la CSB, suelos, encimeras, cajoneras, estanterías, bolsas para infusión intravenosa, bombas de perfusión, baños y contenedores de residuos, entre

otros, así como en guantes, viales y aire. Asimismo, también se han analizado otras matrices como efluentes hospitalarios y aguas residuales [420-424].

La mayoría de los autores analizan un número limitado de compuestos entre los que se incluyen ciclofosfamida, siendo el compuesto mayoritariamente monitorizado, seguido por ifosfamida, 5-fluorouracilo y metotrexato, y en menor medida gemcitabina, doxorubicina, compuestos de platino, paclitaxel, etopósido, epirubicina, irinotecán, vincristina, docetaxel y citarabina, según la frecuencia de monitorización. La mayoría de los métodos evalúan combinaciones de solo unos pocos fármacos; sin embargo, se han llegado a desarrollar metodologías que permiten la determinación de 20 o más compuestos diferentes [177; 232; 265; 420; 425; 426] entre los que se también se incluyen otros fármacos como inmunosupresores (azatioprina), hormonas (tamoxifeno, endoxifeno), antibióticos (ciprofloxacino) y antivirales (ganciclovir).

La separación analítica se realizó mediante equipos de cromatografía líquida y cromatografía de gases, aunque esta última en menor medida y solo para la determinación de 3 compuestos (ciclofosfamida, ifosfamida y 5-fluorouracilo) [73; 131; 176; 205; 220; 225; 234; 236; 258; 260; 263; 266; 271; 278; 282]. En la cromatografía de líquidos los distintos autores emplearon, en su gran mayoría, columnas de fase reversa C18, aunque también se usaron columnas con ligando pentafluorofenil (PFP) [412], bifenil [293; 413] e HILIC [177] para la monitorización de múltiples compuestos. Los tiempos de análisis suelen ser largos, entre 7-40 minutos, con equipos convencionales HPLC [71; 177; 208; 232; 237; 256; 267; 274; 285; 293; 413; 419; 420; 426; 427], mientras que el uso de equipos de ultra alta presión (UHPLC) permite reducir enormemente los tiempos de análisis, entre 2-6 minutos en la mayoría de trabajos [174; 240; 268; 290; 422; 424] o 17,5 minutos en el método desarrollado por Guichard et al. (2019) [428], en el cual determinan 24 compuestos citostáticos en superficies de trabajo.

Las fases móviles más usadas fueron ACN o metanol, o mezclas binarias o ternarias de ambas, utilizando como modificadores disoluciones de carácter ácido como ácido fórmico o ácido acético, o disoluciones tampón tales como acetato amónico, formiato amónico o tampón fosfato. El modo de trabajo habitual fue en modo gradiente, aunque también se han realizado separaciones en modo isocrático de hasta 3 compuestos entre los que se

encuentran ciclofosfamida, paclitaxel, metotrexato, gemcitabina y 5-fluorouracilo [131; 220; 245; 273].

#### 4.2.3. Condiciones de espectrometría de masas

La selección de las transiciones características de cada compuesto se realizó mediante la infusión con jeringa de disoluciones individuales de cada uno de ellos en metanol a una concentración de 10 µg/mL combinada con el efluente del cromatógrafo de líquidos constituido por ácido fórmico 0,1%:ACN (50:50, v/v) a un flujo de 0,15 mL/min (infusión en "T"). Sin embargo, hubo 4 compuestos para los que no se obtuvo ninguna señal analítica (metotrexato, etopósido, docetaxel y paclitaxel), por lo que se prepararon nuevas disoluciones a 10 µg/mL empleando ácido fórmico 0,1%:ACN (90:10, v/v) (disolución de reconstitución) como disolvente, ya que se suponía un problema de precipitación al combinarse con la fase móvil. La infusión de estas nuevas disoluciones hizo posible la detección de los compuestos no detectados inicialmente, por lo que se optó por preparar todas las disoluciones de trabajo utilizando como disolvente la mezcla constituida por ácido fórmico 0,1%: ACN (90:10, v/v). La **Tabla 9** muestra el método de masas empleado en la detección de los compuestos incluidos en la metodología y sus PI.

**Tabla 9:** Método de MRM utilizado para la detección de 12 compuestos citostáticos en superficies y parches dérmicos.

Compuesto	Transición	T <sub>R</sub> (min)	VC	EC	PI
Gemcitabina	<u>264,1&gt;112</u> 265,1>94,7	2,25	25 25	15 39	Dacarbazina-d6
Dacarbazina	<u>183,2&gt;166,1</u> 183,2>123,1	3,47	20 20	9 15	Dacarbazina-d6
Dacarbazina-d6	189,3>172,2	3,38	15	11	-
Metotrexato	<u>455,27&gt;308,5</u> 455,27>134,1	7,20	30 30	31 35	Metotrexato-d3
Metotrexato-d3	458,29>311,6	7,18	30	19	-
Irinotecán	<u>587,2&gt;124,1</u> 587,2>167,2	10,32	50 50	39 39	Irinotecán-d10
Irinotecán-d10	597,3>133,2	10,27	60	35	-
Ciclofosfamida	<u>261,1&gt;140,0</u> 261,1>106,0	11,20	30 30	21 17	Ciclofosfamida-d4

Compuesto	Transición	T <sub>R</sub> (min)	VC	EC	PI
Ciclofosfamida-d4	264,1>140,1	11,12	30	21	-
Doxorubicinol	<u>546,31&gt;399,5</u> 546,31>363,5	9,84	20 20	13 25	Ciclofosfamida-d4
Doxorubicina	<u>544,29&gt;397,6</u> 544,29>130,2	11,12	20 20	13 17	Ciclofosfamida-d4
Epirubicina	<u>544,29&gt;130,1</u> 544,29>361,1	11,93	45 45	17 27	Ciclofosfamida-d4
Etopósido	<u>589,2&gt;229,2</u> 589,2>185,1	13,08	20 20	41 21	Etopósido-d3
Etopósido-d3	592,3>229,2	13,05	20	15	-
Vinorelbina	<u>779,6&gt;122,1</u> 779,6>357,2	13,19	60 60	50 49	Vinorelbina-d3
Vinorelbina-d3	782,6>122,1	13,16	65	47	-
Docetaxel	<u>808,5&gt;527,2</u> 805,5>509,2	14,42	20 20	13 15	Ciclofosfamida-d4
Paclitaxel	<u>854,7&gt;105,1</u> 854,7>286,2	14,46	45 45	50 19	Ciclofosfamida-d4

Las transiciones subrayadas son las empleadas como cuantificadoras. **VC**: voltaje de cono (V); **EC**: energía de colisión (eV); **t<sub>R</sub>**: tiempo de retención (min); **PI**: patrón interno

Los sistemas de detección acoplados con mayor frecuencia a los equipos cromatográficos han sido los espectrómetros de masas, tanto simples como en tándem, aunque también se han usado detectores de ultravioleta acoplados a cromatógrafos de líquidos para la detección de algunos compuestos como 5-fluorouracilo, gemcitabina, metotrexato, paclitaxel, doxorubicina, ciclofosfamida, epirubicina y citarabina [78; 120; 131-133; 193; 219; 220; 245; 258; 262; 286; 415; 416; 429] o detectores de captura electrónica acoplados a cromatógrafos de gases para detectar ciclofosfamida y/o ifosfamida [120; 132; 271].

El analizador más utilizado en la mayoría de los equipos de espectrometría ha sido el cuadrupolo, aunque algunos autores han utilizado la trampa de iones [77; 207; 213; 290; 418; 424].

Finalmente, cabe destacar también el uso de técnicas de inmunoensayo para la detección y cuantificación de algunos compuestos citostáticos como

metotrexato, 5-fluorouracilo, doxorubicina y paclitaxel en superficies, guantes y viales [201; 205; 260; 417].

#### **4.2.4. Validación del método en superficies**

##### **4.2.4.1. Selectividad/Especificidad**

La selectividad se evaluó mediante la preparación de muestras blanco fortificadas con el PI, y su análisis se efectuó con cada una de las rectas de calibrado preparadas durante la validación del método. No se observaron interferencias debido a componentes endógenos de la muestra, ni contribución por parte de los PI a la señal de los analitos, ya que en todos los casos la señal obtenida al tiempo de retención de cada analito fue menor que el LOD.

En la presente metodología no tiene cabida el análisis de varias matrices procedentes de diferentes fuentes dado que la matriz empleada, en este caso el tejido VWR utilizado para la elaboración de los brazaletes y el muestreo de superficies, presenta exactamente la misma composición y características.

Por último, debido a que en el laboratorio de Toxicología se manejan y analizan diferentes drogas de abuso y fármacos, así como la posible preparación de medicación inmunosupresora por parte del personal hospitalario, se evaluó la posibilidad de interferencias debido a distintos compuestos, incluyendo opioides (6-acetilmorfina, codeína, metadona, morfina y EDDP), anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA y MDEA), cocaína (cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina y ecgoninametilester), otras drogas (LSD, ketamina, norketamina, GHB, nicotina y cotinina), fármacos (fentanilo, amitriptilina, paroxetina, zolpidem, zopiclona, ibuprofeno, omeprazol, paracetamol, diclofenaco y narpoxeno), benzodiazepinas (temazepam, alprazolam, 7-aminoflunitrazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lormetazepam, lorazepam, nordiazepam, oxezepam, triazolam, nitrazepam y bromazepam) e inmunosupresores (ácido micofenólico, tacrolimus, sirolimus, everolimus, ciclosporina A y azatioprina). Ninguna de estas sustancias produjo interferencias en la señal analítica correspondiente al tiempo de retención de los compuestos citostáticos objeto de estudio.

#### 4.2.4.2. Modelo de calibración

El modelo de calibración se estudió a partir de ocho niveles de concentración (5, 10, 50, 100, 250, 1000, 2500 y 5000 pg/cm<sup>2</sup>) además de una muestra blanco fortificada con PI. Sin embargo, no todos los compuestos mostraron una buena linealidad en la totalidad del rango, y para algunos compuestos no fue posible realizar una determinación cuantitativa. De este modo se establece una distinción entre los compuestos cuantitativamente validados (gemcitabina, dacarbazina, metotrexato, irinotecán, ciclofosfamida, etopósido, vinorelbina y docetaxel) y los compuestos cualitativamente validados (doxorubicinol, doxorubicina, epirubicina y paclitaxel).

Solo ciclofosfamida exhibió una buena linealidad en todo el rango de calibración estudiado (5-5000 pg/cm<sup>2</sup>). El rango de calibración validado fue de 10 a 5000 pg/cm<sup>2</sup> para gemcitabina; de 50-5000 pg/cm<sup>2</sup> para dacarbazina, metotrexato, irinotecán, etopósido y docetaxel; y de 100 a 5000 pg/cm<sup>2</sup> para vinorelbina.

El modelo matemático para la descripción de la relación entre la concentración del analito y la señal instrumental producida por el detector se seleccionó mediante el estudio de 5 rectas de calibrado realizadas en 5 días diferentes.

El modelo que mejor se ajustó para cada compuesto fue la regresión lineal con ponderación 1/x para gemcitabina, dacarbazina, ciclofosfamida y docetaxel; y la regresión cuadrática con ponderación 1/x para metotrexato, irinotecán, etopósido y vinorelbina.

En todos los casos se cumplieron los requisitos establecidos en la guía de la SWGTOX con respecto al coeficiente de correlación ( $r^2 > 0,99$ ). Sin embargo, los valores de las residuales fueron ligeramente superiores a  $\pm 20\%$  para los calibradores y muestras QC. En este sentido, considerando la aplicación del método analítico (evaluación de la contaminación y determinación de niveles traza de fármacos citostáticos en superficies de trabajo), se siguió el modelo propuesto por Guichard et al. (2019) [265] y se permitió una desviación para las residuales de  $\pm 25\%$ . En todos los casos se cumplió este nuevo criterio. En la **Tabla 10** se recogen los parámetros de calibración medios obtenidos en las 5 rectas de calibrado analizadas para evaluar el modelo matemático de calibración.

**Tabla 10:** Valores medios  $\pm$  desviación estándar de los parámetros relativos al modelo de calibración para los compuestos que siguieron un modelo lineal ( $y=a+b*x$ ) o cuadrático ( $y=a+b*x^2+c*x$ ) en superficies y parches.

Compuesto	$y=a+b*x$ o $y=a+b*x^2+c*x$ (n=5)			
	Ordenada en el origen (a)	Pendiente 1 (b)	Pendiente 2 (c)	$r^2$
Gemcitabina	-0,0936 $\pm$ 0,0639	0,5673 $\pm$ 0,0729	-	0,9970 $\pm$ 0,0021
Dacarbazina	-0,0196 $\pm$ 0,2154	0,2465 $\pm$ 0,0248	-	0,9972 $\pm$ 0,0017
Metotrexato	0,0707 $\pm$ 0,3539	0,1883 $\pm$ 0,0398	0,0002 $\pm$ 0,0001	0,9991 $\pm$ 0,0012
Irinotecán	-0,3466 $\pm$ 0,7700	0,3746 $\pm$ 0,1380	0,0000 $\pm$ 0,0002	0,9983 $\pm$ 0,0013
Ciclofosfamida	0,0009 $\pm$ 0,0162	0,1877 $\pm$ 0,0156	-	0,9984 $\pm$ 0,0007
Etopósido	-0,2254 $\pm$ 0,2115	0,1402 $\pm$ 0,0312	0,0001 $\pm$ 0,0001	0,9985 $\pm$ 0,0009
Vinorelbina	-0,1837 $\pm$ 0,5511	0,2019 $\pm$ 0,0775	0,0001 $\pm$ 0,0001	0,9979 $\pm$ 0,0016
Docetaxel	0,0009 $\pm$ 0,0043	0,0031 $\pm$ 0,0004	-	0,995 $\pm$ 0,0038

#### 4.2.4.3. Límite de detección

El LOD cumplió los criterios de identificación exigidos [relación S/N >3 para las 2 transiciones monitorizadas,  $t_R \pm 0,2$  minutos con respecto al valor medio obtenido para los calibradores, e ión ratio igual al valor medio obtenido en los calibradores  $\pm$  desviación permitida (de acuerdo con los límites de tolerancia establecidos en la Directiva del Consejo Europeo 96/23/EC)] [411].

Los valores de LOD obtenidos oscilaron entre 5 y 100 pg/cm<sup>2</sup>, en función del compuesto. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 11**.

#### 4.2.4.4. Límite de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció teniendo en cuenta la menor concentración de analito que pudo ser cuantificada con adecuada precisión y exactitud, es decir, con un %CV <20% y un MRE  $\pm$ 20%

(**Tabla 11**). En todos los casos, el %CV y el MRE se encontraron dentro del límite establecido, a excepción de docetaxel, para el cual se estableció un %CV <25%, dada la aplicación del método y siguiendo el modelo de Guichard et al. (2019) [265].

**Tabla 11:** Límites de detección y cuantificación de los 12 compuestos citostáticos en superficies y parches dérmicos.

Compuesto	LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	LOQ (pg/cm <sup>2</sup> )
Gemcitabina	5	10
Dacarbazina	5	50
Metotrexato	5	50
Irinotecán	5	50
Doxorubicinol**	50	-
Doxorubicina**	100	-
Epirubicina**	100	-
Ciclofosfamida	5	5
Etopósido	50	50
Vinorelbina	100	100
Docetaxel	50	50
Paclitaxel**	50	-

\*\*Compuestos validados cualitativamente

#### 4.2.4.5. Exactitud y precisión

Los valores de exactitud total y precisión intradía, interdía y total se recogen en la **Tabla 12**. En todos los casos se cumplieron los criterios de aceptación exigidos en cuanto al %CV  $\leq$ 20% y MRE  $\pm$ 20%, excepto en términos de precisión total para etopósido (22,1%) e irinotecán (20,1%), para los cuales se aceptaron valores de %CV  $\leq$ 25%, dada la aplicación del método y siguiendo el modelo propuesto por Guichard et al. (2019) [265].

**Tabla 12:** Resultados de exactitud total y precisión iinterdía, intradía y total para los 8 compuestos citostáticos validados cuantitativamente.

Compuesto	Concentración (µg/cm <sup>2</sup> )	Exactitud Total (n=15)	Precisión Interdía (n=5)	Precisión Intradía (n=15)	Precisión Total (n=15)
		MRE (%)	%CV	%CV	%CV
Gemcitabina	15	8,4	2,2	10,1	10,3
	600	2,7	5,7	9,9	11,4
	2000	-2,0	0,0	9,9	9,9
Dacarbazina	150	-4,4	2,7	8,7	9,1
	600	2,6	0,0	9,3	9,3
	2000	2,0	0,9	8,5	8,6
Metotrexato	150	6,5	7,8	11,0	13,5
	600	5,3	0,0	11,7	11,7
	2000	6,3	8,8	8,5	12,2
Irinotecán	150	-10,3	4,7	15,4	16,1
	600	-7,5	12,7	15,6	20,1
	2000	-9,0	11,5	11,3	16,1
Ciclofosfamida	15	-0,9	1,2	11,3	11,3
	600	0,5	0,0	8,2	8,2
	2000	0,0	0,0	5,2	5,2

Compuesto	Concentración (pg/cm <sup>2</sup> )	Exactitud Total (n=15)	Precisión Interdía (n=5)	Precisión Intradía (n=15)	Precisión Total (n=15)
		MRE (%)	%CV	%CV	%CV
Etopósido	150	-11,0	19,4	10,7	22,1
	600	-0,6	0,0	8,8	8,8
	2000	1,4	13,8	6,0	15,1
Vinorelbina	150	4,0	0,0	11,8	11,8
	600	4,3	0,0	12,6	12,6
	2000	1,7	0,0	13,4	13,4
Docetaxel	150	4,0	9,3	10,0	13,7
	600	12,5	2,1	9,8	10,0
	2000	2,9	0,0	8,6	8,6

#### 4.2.4.6. Efecto matriz

No se observó efecto matriz para irinotecán, ciclofosfamida y etopósido ni para sus análogos deuterados (valores  $\pm 20\%$ ). Los resultados obtenidos para el resto de compuestos muestran un efecto de supresión o potenciación de la señal analítica dependiente de compuesto, el cual se ve compensado en magnitud similar por el PI (**Tabla 13**).

Los compuestos para los cuales se produjo una supresión de la señal fueron gemcitabina y dacarbazina a QC bajo, y vinorelbina a QC bajo y alto. Para dacarbazina y vinorelbina se emplearon sus análogos deuterados como PI, que mostraron este efecto en magnitud similar. Sin embargo, para gemcitabina se empleó dacarbazina-d6 como PI debido a la ausencia de su análogo deuterado. El efecto supresor para gemcitabina a QC bajo fue mayor en comparación con el observado para el PI; sin embargo, para este compuesto se cumplieron los criterios de aceptación establecidos para el LOQ, la precisión y la exactitud.

Los compuestos para los que se produjo un efecto potenciador de la señal fueron metotrexato, doxorubicinol, doxorubicina, epirubicina, docetaxel y paclitaxel. Este efecto también se observó en magnitud similar para el PI metotrexato-d3. Por el contrario, los demás compuestos no disponen de PI propio, por lo que se utilizó ciclofosfamida-d4 para todos ellos. Esto podría comprometer la cuantificación y la validación en términos de exactitud, precisión y LOD/LOQ. Sin embargo, el grupo de las antraciclinas (doxorubicinol, doxorubicina y epirubicina) solo se validó cualitativamente por no cumplir los criterios de linealidad, precisión y exactitud. Además, dado que estos compuestos presentaron un efecto matriz positivo, este efecto no implicaría posibles problemas de detección al LOD. Por su parte, los altos valores observados en el grupo de los taxanos (docetaxel y paclitaxel) se deben a que estos compuestos originan una señal muy baja en muestra "neat", y la sensibilidad se incrementa notablemente al fortificarlos tras la extracción de la muestra. De esta manera, suponemos que, probablemente, algún componente del tejido de muestreo produce un aumento de la señal. De estos dos compuestos, solo docetaxel se validó cuantitativamente y se cumplieron los requisitos establecidos de linealidad, precisión y exactitud.

Los %CV en muestras fortificadas tras la extracción fueron  $<20\%$  para todos los compuestos, indicando una baja variabilidad entre los distintos

replicados empleados para evaluar el efecto matriz, a excepción de vinorelbina, cuya variabilidad se ve compensada en magnitud similar por el PI, y de paclitaxel a QC alto.

#### 4.2.4.7. Rendimiento de extracción y eficiencia del proceso

El rendimiento de extracción osciló entre el 10,8% y el 75,0% en función del compuesto. Por su parte, la eficiencia del proceso se mantuvo entre 15,7% y 68,3%. Este valor tan alto se debe al gran efecto matriz positivo de paclitaxel. Los valores de %CV para las muestras fortificadas en la placa de acero inoxidable fueron <20% para todos los compuestos a excepción de doxorubicina, epirubicina, vinorelbina y paclitaxel. En el caso de vinorelbina, la variabilidad obtenida se compensa en magnitud similar con la del PI. La **Tabla 13** recoge los resultados obtenidos para cada compuesto, así como para los PI.

La baja recuperación obtenida para los compuestos se debe, probablemente, a su retención en la placa de acero inoxidable, ya que la recuperación observada para los análogos deuterados, los cuales son añadidos al tejido una vez realizado el muestreo, fue cercana al 100% en todos los casos. De hecho, para muchos de los compuestos se observó un importante *carry over*, por lo que fue necesario realizar una limpieza extensa de la placa tras cada uso.

**Tabla 13:** Resultados de efecto matriz, rendimiento de extracción y eficiencia del proceso (%) para todos los compuestos.

Compuesto	Efecto matriz		Rendimiento de extracción		Eficiencia del proceso	
	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto
Gemcitabina	-51,6	-11,6	71,4	72,2	34,6	63,8
Dacarbazina	-29,1	-13,4	53,9	61,4	38,2	53,2
Metotrexato	80,5	76,6	35,5	43,0	63,7	76,0
Irinotecán	-6,3	-4,5	52,7	53,0	49,4	50,6
Doxorubicinol	197,2	174,8	18,2	24,8	54,1	68,3
Doxorubicina	167,0	204,2	10,8	15,2	28,8	46,3
Epirubicina	224,7	303,1	12,1	15,0	39,4	60,4
Ciclofosfamida	1,6	9,3	74,3	75,0	75,5	82,0
Etopósido	1,9	-13,7	60,1	55,0	61,3	47,5
Vinorelbina	-38,6	-58,3	25,6	47,8	15,7	19,9
Docetaxel	171,9	18,6	43,2	47,4	117,4	56,3

Compuesto	Efecto matriz		Rendimiento de extracción		Eficiencia del proceso	
	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto
Paclitaxel	1268,9	296,7	50,0	47,4	683,9	188,2
Dacarbazina-d6	-27,7	-17,6	98,9	101,2	71,5	83,4
Metotrexato-d3	68,4	66,3	99,0	92,1	166,8	153,2
Irinotecán-d10	-3,9	-7,8	103,1	93,1	99,1	85,8
Ciclofosfamida-d4	-1,5	1,1	101,8	102,2	100,2	103,4
Etopósido-d3	2,1	-14,2	96,3	86,2	98,3	74,0
Vinorelbina-d3	-53,1	-60,3	155,3	164,1	72,8	65,2

#### 4.2.4.8. Estabilidad

El porcentaje de pérdida o ganancia con respecto al valor obtenido en muestras QC preparadas frescas y analizadas simultáneamente se encontró dentro del límite establecido (% pérdida/ganancia  $\pm 20\%$ ) en todos los casos. La **Tabla 14** recoge los valores de estabilidad para cada compuesto.

El porcentaje de pérdida o ganancia calculado para todos los analitos cuando las muestras se reinyectaron tras su almacenamiento durante 72 horas a 6°C en el “autosampler” osciló entre -18,7% y 8,6%.

En cuanto a la estabilidad a largo plazo, los porcentajes de pérdida o ganancia calculados tras la conservación de las muestras durante 2 meses a -22°C estuvieron comprendidos entre -14,9% y 10,6%.

**Tabla 14:** Resultados de estabilidad para cada compuesto en superficies y parches dérmicos en comparación con muestras frescas (%).

Compuesto	Estabilidad “autosampler”		Estabilidad -22°C	
	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto
Gemcitabina	0,0	-3,1	-4,4	-12,0
Dacarbazina	-1,9	2,4	2,0	0,3
Metotrexato	-1,5	-0,7	-2,0	-2,9
Irinotecán	3,2	2,9	0,2	1,8
Doxorubicinol	-2,8	-4,8	-13,8	-14,9
Doxorubicina	-8,8	-6,1	-11,6	-3,7
Epirubicina	-2,4	-3,5	4,3	-1,0
Ciclofosfamida	-4,2	4,5	-2,3	-0,9
Etopósido	1,1	-1,1	0,0	-0,4

Compuesto	Estabilidad "autosampler"		Estabilidad -22°C	
	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto
Vinorelbina	8,6	-3,0	6,6	-9,5
Docetaxel	-18,7	-0,3	10,6	-1,8
Paclitaxel	5,4	7,3	-7,0	-13,7

Los resultados obtenidos para cada parámetro de validación se resumen en la **Tabla 15**.

**Tabla 15:** Parámetros de validación evaluados y resultados obtenidos para cada uno de ellos en la metodología de superficies.

Parámetro	Resultados
Selectividad	Sin interferencias
Especificidad	Sin interferencias
Linealidad	Linealidad desde LLOQ hasta 5000 pg/cm <sup>2</sup>
Límite de detección y cuantificación	LOD y LLOQ entre 5-100 pg/cm <sup>2</sup>
Exactitud	Exactitud: -10,3% a 12,5%
Precisión	Intra-día: 5,2% a 15,6% Inter-día: 1,2% a 19,4% Total: 5,2% a 22,1%
Efecto matriz	Supresión de la señal: -58,3% a -11,6% Sin efecto matriz: -13,7% a 9,3% Aumento de la señal: 76,6% a 1268,9%
Rendimiento de extracción	Recuperación: 10,8% a 75,0%
Eficiencia del proceso	Eficiencia: 15,7% a 683,9%
Estabilidad "autosampler"	% de pérdida/ganancia: -18,7% y 8,6%
Estabilidad a largo plazo	% de pérdida/ganancia: -14,9% y 10,6%

#### 4.2.5. Validación del método en brazaletes

Los tejidos VWR fueron validados a 2 concentraciones diferentes, realizando la toma de muestra tras haber dejado los tejidos expuestos más de 8 horas al ambiente para simular las condiciones de una jornada laboral, y cuantificándolos utilizando una recta muestreada con tejidos nuevos. Los valores de precisión y exactitud obtenidos en los tejidos a QC bajo y alto fueron satisfactorios (%CV <20% y MRE ±20%), con valores de %CV comprendidos entre 1,5% y 17,9%, y entre -3,9% y 17,5% para el MRE, a excepción de docetaxel, para cual se obtuvo un MRE de 23,6% a QC alto.

En cuanto a la validación de los distintos métodos analíticos publicados, se han seguido las recomendaciones incluidas en diferentes guías de validación, siendo la guía de la Food and Drug Administration (FDA) la más empleada en la mayoría de las metodologías publicadas. Otras guías utilizadas por algunos autores han sido las publicadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), la Agencia Nacional de Vigilancia de la Salud (ANVISA), el Instituto Nacional de Metrología, Normalización y Calidad Industrial (INMETRO), la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la Conferencia Internacional de Harmonización (ICH), EURACHEM/CITAC y la Occupational Safety and Health Administration (OSHA), así como las recomendaciones de la Sociedad Francesa de Ciencia y Tecnología Farmacéutica (SFSTP) y de la Agencia Francesa de Acreditación (COFRAC). Sin embargo, entre las distintas guías no existe un consenso unificado, por lo que siguen directrices diferentes en cuanto a los parámetros a validar, y muchas de ellas no establecen de forma clara los ensayos a realizar y los criterios exigidos para cada uno de ellos. Los parámetros incluidos en la mayoría de las guías son: linealidad, exactitud y precisión, LOQ, estabilidad y selectividad. Otros parámetros como efecto matriz, recuperación, robustez, efecto de la dilución o *carry-over* fueron evaluados con menor frecuencia.

En relación con los resultados de validación obtenidos por los distintos estudios, cabe destacar el LOD y el LOQ. Estos parámetros varían considerablemente de un estudio a otro, por lo que pueden tomar un gran rango de valores. Además, debido a que en muchos de los trabajos las unidades de medida no son las mismas (los resultados pueden expresarse en ng/muestra, pg/cm<sup>2</sup> o pg/mL), y la metodología analítica no queda completamente definida, es difícil realizar una comparación entre los distintos trabajos presentes en la bibliografía. Los valores de LOD descritos en la literatura para los compuestos monitorizados en el presente trabajo se encuentran entre 0,05-200 pg/cm<sup>2</sup>, y los valores de LOQ entre 0,5-250 pg/cm<sup>2</sup> en función del compuesto y de la metodología utilizada. Es importante destacar la influencia del área muestreada ya que, dado que lo que se evalúa es cantidad de compuesto, se obtendrá un menor LOD/LOQ cuanto mayor sea el área de la superficie a muestrear.

Por otro lado, existen diferencias en el modo de preparación de las rectas de calibrado ya que algunos autores elaboran los calibradores

directamente sobre el tejido, sin realizar la etapa de muestreo [232; 296; 297; 412], o incluso en disolución [265; 288; 427]. Esta metodología podría afectar a la cuantificación de las muestras reales, ya que no considera la recuperación o la eficacia de muestreo, por lo que se infravalorarían los resultados obtenidos. Otros autores utilizan solo unos pocos compuestos análogos modificados ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ ) como PI en comparación con la variedad de fármacos que evalúan [288; 427]. Destaca así el método desarrollado por Guichard et al. (2019) [265], en el cual monitorizan 25 compuestos y utilizan 5 PI diferentes, o el método descrito por Gómez-Canela et al. (2013) [426], en el cual se utiliza ciclofosfamida-d4 como PI para la determinación de 26 compuestos. Sin embargo, debido a factores económicos o de disponibilidad del producto, esta práctica puede ser válida siempre que se cumplan los criterios de validación requeridos por las guías. Por otro lado, también se ha visto el uso como PI de otros compuestos no análogos de estructura diferente, entre ellos hexametilfosforamida, prednisolona o metilclonazepam [212; 213; 268; 419], o compuestos de estructura similar a los fármacos de interés como trofosfamida, cefalomanina, carminomicina, daunorubicina, campoteticina, ifosfamida o 5-clorouracilo [177; 204; 216; 232; 244; 279]. A pesar de que en estos estudios se obtuvieron resultados aceptables para muchos de los compuestos en cuanto al coeficiente de correlación ( $>0,99$ ) y en términos de exactitud y precisión ( $\pm 15\%$  o  $\pm 20\%$  según la guía de referencia utilizada), esta práctica no es recomendable y podría comprometer la cuantificación, ya que no se puede descartar la presencia de estos compuestos, también de uso clínico, en las superficies muestreadas, lo que incrementaría la señal del PI y subestimaría la concentración detectada de los citostáticos de interés. En técnicas analíticas, especialmente con el uso de MS, lo recomendable sería la utilización del PI correspondiente al compuesto de interés, debido al efecto que otros componentes de la matriz pueden ejercer en la ionización y detección de los analitos, por lo que un PI de estructura y características similares al analito de interés sufriría los mismos procesos y compensaría sus efectos. Sin embargo, en el caso de determinaciones multianalito, esta práctica puede resultar inalcanzable debido a los factores comentados anteriormente (económicos o de disponibilidad del producto). Por tanto, con respecto al uso como PI de compuestos análogos modificados muy diferentes estructuralmente al compuesto de interés, se espera que estos compuestos se comporten de manera distinta. Sin embargo, dado que se trata de muestras de superficies recogidas con un tejido, la matriz presenta la misma

composición en todos los casos, por lo que estos efectos no serían tan variables como si se tratase de una matriz líquida compleja como sangre u orina. Esto puede observarse en el bajo porcentaje de CV (<20%) obtenido en muestras fortificadas en la placa de acero inoxidable para la mayoría de compuestos, a excepción de doxorubicina, epirubicina, vinorelbina, docetaxel y paclitaxel, que mostraron un mayor CV para alguno de los QCs.

Además, también se ha observado la adición del PI una vez realizada la extracción [255] o sobre la superficie muestreada [213; 244]. En este último caso, el PI consistió en un fármaco (prednisolona), por lo que añadirlo sobre las superficies no generaría un riesgo de exposición adicional, aunque según lo comentado anteriormente, no sería un PI adecuado puesto que este compuesto podría estar presente como contaminante en las superficies de trabajo, lo que daría lugar a una subestimación de los compuestos de interés. Por lo general, linealidad, exactitud y precisión y LOD/LOQ son los parámetros mayormente validados en la mayoría de publicaciones [244; 262; 290; 293; 297; 413; 427], aunque algunos autores también incluyen estabilidad y recuperación [265; 271; 412] o efecto matriz [177; 232], o realizan una validación completa [254] o casi completa [71; 256], en la cual también se evalúa la selectividad/especificidad y la robustez. Por el contrario, otros métodos descritos no informan acerca de la validación realizada [203; 209; 212; 213; 255; 270; 415] o la información que aportan es escasa [178; 261; 268; 414; 418].

Por tanto, el método descrito en este capítulo se presenta como un método multianálisis para la determinación de 12 fármacos citostáticos en superficies, completamente validado, que emplea como PI 5 compuestos análogos deuterados. La utilización de un criterio de aceptación de  $\pm 25\%$ , según el modelo propuesto por Guichard et al. (2019) [265], se debe a que todas las pruebas fueron realizadas fortificando la placa de acero inoxidable, por lo que la técnica de muestreo y la presión ejercida pueden jugar un papel importante en la eficacia de recuperación de los compuestos, dando lugar a una mayor variabilidad entre los distintos replicados de las muestras QC e incluso en los calibradores. Además, un criterio de aceptación más amplio no afecta a la interpretación de los resultados dado que, a pesar de realizar una valoración cuantitativa para la mayoría de los compuestos, lo que se pretende es demostrar la presencia o ausencia de contaminación.

#### 4.2.6. Aplicación a casos reales

La metodología analítica descrita y validada en este capítulo se aplicó para la determinación de contaminación por compuestos citostáticos en el ambiente de trabajo, y zonas adyacentes al mismo, de profesionales sanitarios en contacto con estos fármacos, mediante la recogida y análisis de muestras de superficies de distintas localizaciones. También se recogieron y analizaron parches colocados en los antebrazos de los trabajadores. Todas las muestras fueron recogidas en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela en 3 campañas de monitorización diferentes durante los años 2019 y 2020. Durante las 2 primeras campañas de monitorización se tomaron muestras durante un único día, mientras que en la última campaña, realizada a lo largo de una semana, se recogieron muestras en 3 días alternos, por lo que hablaremos de 5 fases de monitorización.

El número total de preparaciones de los compuestos monitorizados fue de 196 durante toda la semana que duró la tercera campaña de monitorización, oscilando entre 1 y 52 preparados en función del compuesto. Cada participante realizó entre 9 y 62 preparaciones de los compuestos monitorizados. El total de formulaciones de compuestos citostáticos elaboradas fue de 381 (14-127 según el participante), entre los que se incluyen, además de los compuestos evaluados, otros fármacos tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, idarubicina, citarabina, azacitidina, bortezomib, pemetrexed, ifosfamida, bleomicina, vincristina, vinblastina, mitomicina C, ciclosporina, micofenolato mofetilo, tiotepa y melfalán. Otros compuestos no citostáticos elaborados habitualmente han sido los anticuerpos monoclonales, aunque su frecuencia no ha sido registrada. La cantidad total preparada de cada compuesto durante la semana de monitorización correspondiente a la campaña número 3 osciló entre 672 mg (dacarbazina) y 33250 mg (gemcitabina).

Se muestrearon diferentes superficies del Área de Farmacia y Oncología, manteniéndose muchas de ellas constantes durante las 3 campañas realizadas. La primera campaña, con solo 12 muestras, sirvió para realizar una primera aproximación de la aplicabilidad del método analítico. La segunda campaña fue realizada en agosto del 2019 y se recogieron 35 muestras de distintas zonas de trabajo. La última y más extensa campaña de monitorización se llevó a cabo durante la primera semana de agosto del año

2020 en 3 días no consecutivos de la semana, recogándose un total de 134 muestras. En la primera campaña solo se recogieron muestras del Servicio de Farmacia del Área de Oncología, mientras que en las dos campañas posteriores se recogieron muestras de ambos Servicios y Áreas. Además, en la tercera campaña también se recogieron muestras del Área de Pacientes del Hospital de Día de Onco-Hematología.

La mayoría de las muestras tomadas en los Servicios de Farmacia fueron recogidas al finalizar el turno de trabajo, a excepción de las CSB y los suelos enfrente de las CSB, que también se recogieron antes del comienzo del turno. Las muestras recogidas en el Área de Pacientes del Hospital de Día (bombas de infusión y suelos debajo de las bombas) fueron tomadas durante toda la jornada en aquellas bombas que se sabía que habían sido empleadas para la infusión de alguno de los compuestos incluidos en la metodología. En cuanto a los procedimientos de limpieza, las superficies de trabajo de las dos CSB del área de Oncología se limpian al finalizar el turno de mañana con agua y jabón, se dejan secar, y a continuación se limpian de nuevo con etanol 96<sup>o</sup>. La superficie de trabajo de la CSB ubicada en el Área de Farmacia se limpia al finalizar el turno de tarde y nuevamente por la mañana antes de comenzar el turno, utilizando una gasa con etanol 96<sup>o</sup>. La limpieza de las CSB corre a cargo de los trabajadores implicados en la preparación de las formulaciones. Por su parte, el servicio de limpieza es el encargado de la limpieza de los suelos, los baños de los pacientes y los sillones de perfusión del Área de Pacientes.

Se obtuvieron un total de 181 muestras de superficies u objetos, de las cuales 150 corresponden a muestras de superficies y 31 corresponden a muestras de viales, blísteres de medicamentos, bolsas de infusión y abertura del contenedor de residuos de la CSB. Las muestras de superficies se escogieron entre los Servicios de Farmacia (n= 112 muestras), que incluyen 2 zonas de preparación ubicadas en áreas diferentes y una zona de dispensación de medicamentos orales, y las Áreas de Pacientes del Hospital de Día de Onco-Hematología (n= 38 muestras). Todas las muestras de viales, blísteres, bolsas de infusión y el contenedor de la CSB fueron tomadas en el Servicio de Farmacia del Área de Oncología.

El total de muestras positivas fue del 58% (n= 105), cifra que corresponde al 57,3% (n= 86) en muestras de superficies y al 61,3% (n= 19) en muestras de viales, blísteres, bolsas de infusión y contenedor de la CSB.

La distribución por Servicio establece un porcentaje de muestras de superficies positivas del 47,1% (n= 16) en el Servicio de Farmacia del Área de Farmacia, del 60,3% (n= 47) en el Servicio de Farmacia del Área de Onco-Hematología, y del 60,5% (n= 23) en el área de pacientes de Onco-Hematología. Los resultados se expresan en  $\text{pg}/\text{cm}^2$ , considerando una superficie de  $212,25 \text{ cm}^2$  para las bombas de perfusión,  $620 \text{ cm}^2$  para la tapa del inodoro y el teclado del ordenador,  $66 \text{ cm}^2$  para el ratón del ordenador y  $100 \text{ cm}^2$  para todas las demás superficies. Se detectó la presencia de gemcitabina, metotrexato, irinotecán, ciclofosfamida, doxorubicinol, doxorubicina, epirubicina, etopósido, vinorelbina, docetaxel y/o paclitaxel en alguna de las muestras de superficies. La **Tabla 16** recoge los resultados de las muestras de superficies que han sido positivas, así como su localización, el período en el que se recogieron (antes o después del turno), si se ha realizado la limpieza previa de las superficies, y la fase de monitorización, ordenadas según el tipo de muestra.

Se obtuvieron también muestras contaminadas pertenecientes a blísteres de fármacos en la zona de dispensación de medicamentos orales (50%, n=2), en los viales comerciales (70,6%, n= 12), y en las bolsas de infusión tras su preparación (42,9%, n=3). También se detectó contaminación en el exterior del contenedor de residuos de la CSB y en la cara exterior de los filtros HEPA de la CSB. Las cantidades encontradas para cada compuesto en las muestras de viales, blísteres, bolsas de infusión, contenedor de la CSB y filtro HEPA se expresan en ng debido a que no se conoce el área de la superficie muestreada. Se detectó la presencia de gemcitabina, dacarbazina, metotrexato, irinotecán, ciclofosfamida, etopósido y/o paclitaxel. La **Tabla 17** indica el tipo de muestra recogida, los resultados obtenidos y la fase de monitorización en la que se obtuvo la muestra. Además, en la **Tabla 18** y **Tabla 19** se recoge de forma resumida el número y porcentaje de resultados positivos para cada compuesto, y los valores descriptivos como la media obtenida, mediana, mínimo y máximo para las muestras de superficies y para las muestras de viales, blísteres y bolsas de infusión, respectivamente.

**Tabla 16:** Muestras de superficies con resultado positivo, localización, período de muestreo, limpieza, resultado y fase de monitorización.

Superficie	Servicio	Período	Limpieza	Resultados (pg/cm <sup>2</sup> )	Fase
CSB-1	Farmacia	Inicio	-	MTX= 1450,2	4
CSB-1	Farmacia	Fin	No	Gem= 12,1; MTX= 88,8	4
CSB-1	Farmacia	Inicio	-	Gem= 22,5	5
CSB-1	Farmacia	Fin	No	Gem= 19,2	5
Suelo CSB-1	Farmacia	Fin	No	CP= 5,0	2
Suelo CSB-1	Farmacia	Inicio	No	CP= 6,1	3
Suelo CSB-1	Farmacia	Fin	No	CP= 5,6	3
Suelo CSB-1	Farmacia	Inicio	No	CP= 14,4	4
Suelo CSB-1	Farmacia	Fin	No	CP= 6,5	4
Suelo CSB-1	Farmacia	Inicio	No	Gem= 10,0; CP= 17,2	5
Suelo CSB-1	Farmacia	Fin	No	Gem= 10,3; CP= 21,2	5
Suelo entrada	Farmacia	Fin	No	CP= 5,0	3
Suelo entrada	Farmacia	Fin	No	CP= 6,0	4
Suelo exterior	Farmacia	Fin	No	CP= 5,0	3
Suelo exterior	Farmacia	Fin	No	CP= 5,8	4
Suelo exterior	Farmacia	Fin	No	CP= 5,3	5
CSB-2	H. Día	Fin	No	CP= 5,0	1
CSB-3	H. Día	Fin	No	Iri= 50,9	1
CSB-3	H. Día	Inicio	Sí	CP= 6,5	3
CSB-3	H. Día	Fin	No	CP= 5,7	3
CSB-2	H. Día	Inicio	Sí	CP= 809,6	4
CSB-2	H. Día	Fin	No	CP= 301,8	4
CSB-2	H. Día	Inicio	Sí	CP= 457,9	5
CSB-2	H. Día	Fin	No	CP= 418,5	5

<b>Superficie</b>	<b>Servicio</b>	<b>Período</b>	<b>Limpieza</b>	<b>Resultados (pg/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Fase</b>
CSB-3	H. Día	Inicio	Sí	CP= 5,0	5
Suelo CSB-3	H. Día	Inicio	Sí	Gem= 110,3; CP= 10,0	2
Suelo CSB-3	H. Día	Fin	No	Gem= 51,8; CP= 10,3	2
Suelo CSB-3	H. Día	Inicio	Sí	CP= 12,1	3
Suelo CSB-3	H. Día	Fin	No	CP= 17,5	3
Suelo CSB-2	H. Día	Inicio	Sí	CP= 189,9	4
Suelo CSB-2	H. Día	Fin	No	CP= 213,7	4
Suelo CSB-2	H. Día	Inicio	Sí	CP= 144,6	5
Suelo CSB-2	H. Día	Fin	No	CP= 381,4	5
Suelo CSB-3	H. Día	Fin	No	CP= 17,6	5
Suelo antesala	H. Día	Fin	No	Gem= 27,4; CP= 12,3	2
Suelo antesala	H. Día	Fin	No	CP= 53,0	3
Suelo antesala	H. Día	Fin	No	CP= 23,6	4
Suelo antesala	H. Día	Fin	No	CP= 19,7	5
Suelo exterior	H. Día	Fin	No	CP= 16,3	5
Cajetín	H. Día	Fin	No	CP= 17,3	2
Cajetín	H. Día	Fin	No	CP= 11,9	2
Cajetín	H. Día	Fin	No	CP= 6,1	3
Cajetín	H. Día	Fin	No	CP= 9,4	5
Cajetín	H. Día	Fin	No	CP= 27,6	5
Carro CSB-3	H. Día	Fin	No	Gem= 28,7; CP= 14,0	2
Carro CSB-2	H. Día	Fin	No	CP= 12,2	4
Carro CSB-2	H. Día	Fin	No	Pacli= 466,8*	5
Encimera	H. Día	Fin	No	Gem= 46,8; CP= 9,8	2
Encimera	H. Día	Fin	No	CP= 38,2	3

Parte experimental (1): Fármacos citostáticos en superficies y parches dérmicos

Superficie	Servicio	Período	Limpieza	Resultados (pg/cm <sup>2</sup> )	Fase
Encimera	H. Día	Fin	No	CP= 15,7	4
Encimera	H. Día	Fin	No	CP= 12,7	5
Mesa documentación	H. Día	Fin	No	Gem= 13,8; CP= 5,0	2
Mesa documentación	H. Día	Fin	No	CP= 17,8	3
Teclado PC	H. Día	Fin	No	CP= 0,97	4
Teclado PC	H. Día	Fin	No	CP= 0,81	5
Bomba IV	Onco	-	No	Gem= 7,54	2
Bomba IV	Onco	-	No	Gem= 10,23	2
Bomba IV ETP	Onco	-	No	Iri= 48,1	4
Bomba IV CP	Onco	-	No	Iri= 23,65	5
Suelo bomba	Onco	-	No	Doce= 24,55	3
Suelo bomba	Onco	-	No	Doce= 1335,1	3
Suelo bomba Gem	Onco	-	No	Gem= 15,7	4
Suelo bomba Pacli	Onco	-	No	Gem= 10,0	5
Sillón Gem	Onco	-	No	CP= 9,8	4
Sillón Pacli	Onco	-	No	CP= 16,8	5
Sillón CP	Hemato	-	No	CP= 14,3	5
Inodoro	Onco	-	Sí	Gem= 76,24; Iri= 832,08; CP= 23,45; ETP= 37,24; VBN= 20,53; Pacli= 684,47*	2
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 139,82; Iri= 572,9; CP= 13,94; ETP= 17,4; VBN= 16,81; Pacli= 372,5*	2
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 29,19; Iri= 179,0; CP= 15,24; ETP= 155,63; Doce= 28,53; Pacli= 653,73*; Doxo= 16,59*; Epi= 15,22*	2

<b>Superficie</b>	<b>Servicio</b>	<b>Período</b>	<b>Limpieza</b>	<b>Resultados (pg/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Fase</b>
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 15299,56; Iri= 2885,87; CP= 0,89; ETP= 974,61; Pacli= 3366,11*	3
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 17,97; Iri= 1454,26; CP= 1,6; Pacli= 121,32*	3
Inodoro	Onco	-	Sí	Gem= 14,97; Iri= 991,98; CP= 5,71; Pacli= 1156,39*	3
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 7,61; Iri= 452,84; CP= 2,76; Pacli= 105,98*	4
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 65,19; Iri= 530,19; CP= 8,0; ETP= 599,68; Pacli= 2594,82*	4
Inodoro	Onco	-	No	Gem= 996,13; Iri= 486,48; CP= 11,47; ETP= 212,74; Pacli= 377,1*	5
Inodoro	Onco	-	Sí	Gem= 511,66; Iri= 897,6; CP= 36,52; ETP= 379,13; Pacli= 579,74*	5
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 291,2; Iri= 234,0; CP= 24,1; Epi= 10,52*	1
Suelo inodoro	Onco	-	Sí	Gem= 35,1; Iri= 470,8; CP= 5,0; Pacli= 484,8*	2
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 516,7; Iri= 250,8; ETP= 96,9; Pacli= 1023,5*	2
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 461,6; Iri= 1231,5; CP= 48,4; Pacli= 1858,5*	3
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 11123,1; Iri= 2309,4; CP= 17,5; ETP= 733,2; Pacli= 154,59*	3
Suelo inodoro	Onco	-	Sí	Gem= 71,4; Iri= 311,8; CP= 52,7; Pacli= 2740,6*	3

Parte experimental (1): Fármacos citostáticos en superficies y parches dérmicos

Superficie	Servicio	Período	Limpieza	Resultados (pg/cm <sup>2</sup> )	Fase
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 1087,1; Iri= 8224,0; CP= 71,1; ETP= 1150,7; Doce= 128,7; Pacli= 19113,0*	4
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 3513,5; Iri= 269,4; CP= 12,7; ETP= 220,6; Pacli= 942,8*	4
Suelo inodoro	Onco	-	No	Gem= 4003,4; Iri= 11275,5; CP= 93,5; ETP= 591,0; Pacli= 11188,4*	5
Suelo inodoro	Onco	-	Sí	Gem= 594,7; Iri= 5917,1; ETP= 77,0; VBN= 318,4; Pacli= 9740,6*; Doxol= 6,45*; Epi= 41,85*	5

\*Estos compuestos fueron validados cualitativamente, por lo que el resultado numérico es orientativo y solo pretende reflejar el grado de exposición. CP= ciclofosfamida, Doce= docetaxel, Doxo= doxorubicina, Doxol= doxorubicinol, Epi= epirubicina, ETP= etopósido, Gem= gemcitabina, Iri= irinotecán, MTX= metotrexato, Pacli= paclitaxel; VBN= vinorelbina. "Farmacia" hace referencia a la zona de preparación del Área de Farmacia en el Servicio de Farmacia. "H. Día" hace referencia al Área de Farmacia del Servicio de Oncología. "Onco" y "Hemato" hacen referencia a las salas de administración del Hospital de Día del Servicio de Onco-Hematología.



**Tabla 17:** Resultados obtenidos en muestras de viales, blísteres, bolsas de infusión, contenedor de residuos de CSB y filtros HEPA (ng).

Muestra	Servicio	Resultados (ng)	Fase
Viales Iri	H. Día	Gem= 1,0	2
Viales Gem	H. Día	Gem= 70,85	2
Viales Gem	H. Día	Gem= 1631,51	3
Viales CP	H. Día	CP= 0,51	2
Viales CP	H. Día	CP= 0,92	3
Viales Daca	H. Día	Daca= 19,2	4
Viales Doxo	H. Día	Gem= 1,46; CP= 1,98	4
Vial Doxo usado	H. Día	CP= 0,9	4
Viales MTX	H. Día	Gem= 1,6; MTX= 26,87	4
Viales Doce	H. Día	Gem= 1,0	5
Viales ETP	H. Día	ETP= 5,03	5
Viales Iri	H. Día	Gem= 55,39; Iri= 111,6	5
Bolsa I.V. ETP	H. Día	CP= 0,6	3
Bolsa I.V. Pacli	H. Día	Pacli= 5,05*	4
Bolsa I.V. Gem	H. Día	Gem= 33,4	5
Blíster CP	H. Día	CP= 0,82	3
Blíster ETP	H. Día	ETP= 264,39	4
Contenedor residuos CSB	H. Día	CP= 0,51	4
Filtros CSB	H. Día	Gem= 333,42; Iri= 39,3; CP= 6230,37; Pacli= 5,24*	5

\*Estos compuestos fueron validados cualitativamente, por lo que el resultado numérico es orientativo y solo pretende reflejar el grado de exposición.

CP= ciclofosfamida, Daca= dacarbazina, ETP= etopósido, Gem= gemcitabina, Iri= irinotecán, MTX= metotrexato, Pacli= paclitaxel. "H. Día" hace referencia al Área de Farmacia del Servicio de Oncología.

**Tabla 18:** Valores encontrados en las superficies muestreadas (pg/cm<sup>2</sup>).

Compuesto	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº positivos	% positivos
Gemcitabina	1121,50	46,80	7,54	15299,56	35	23,33%
Dacarbazina	-	-	-	-	0	0%
Metotrexato	769,5	769,5	88,8	1450,2	2	1,33%
Irinotecán	1734,79	530,19	23,65	11275,5	23	15,3%
*Doxorubicinol	6,45	-	-	-	1	0,67%
*Doxorubicina	16,59	-	-	-	1	0,67%
*Epirubicina	22,53	15,22	10,52	41,85	3	2%
Ciclofosfamida	56,3	13,94	0,81	809,6	71	47,3%
Etopósido	422,08	318,4	17,24	1150,7	13	8,67%
Vinorelbina	18,67	18,67	16,81	20,53	2	1,33%
Docetaxel	379,22	78,62	24,55	1335,1	4	2,67%
*Paclitaxel	2972,17	942,8	105,98	19131,0	21	14%

\*Doxorubicinol, doxorubicina, epirubicina y paclitaxel han sido validados cualitativamente, por lo que el resultado numérico es orientativo y solo pretende reflejar el grado de contaminación.

**Tabla 19:** Valores de contaminación encontrados en viales, blísteres y bolsas de infusión (ng) (n=29).

Compuesto	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Nº positivos	% positivos
Gemcitabina	224,53	17,5	1	1631,51	8	27,59%
Dacarbazina	19,2	19,2	19,2	19,2	1	3,22%
Metotrexato	26,87	26,87	26,87	26,87	1	3,22%
Irinotecán	111,6	111,6	111,6	111,6	1	3,45%
Ciclofosfamida	0,96	0,86	0,51	1,98	6	20,69%
Etopósido	134,71	134,71	5,03	264,34	2	6,45%
*Paclitaxel	5,05	5,05	5,05	5,05	1	3,45%

\*Paclitaxel ha sido validado cualitativamente, por lo que el resultado numérico es orientativo y solo pretende reflejar el grado de contaminación.

Los resultados obtenidos en superficies muestran una contaminación continuada en la superficie de trabajo de las CSB, suelos, carros laterales y encimeras, lo que puede ser reflejo de una limpieza ineficiente, de la contaminación procedente de viales, de la cesión al aire de partículas desde los filtros HEPA de la CSB o una combinación de todos ellos. Además, el proceso de preparación también genera contaminación, lo que se puede

observar en los resultados obtenidos en la CSB-1 del Área de Farmacia durante la fase 4, la cual no pudo ser muestreada antes del inicio del turno de trabajo debido a la urgencia de preparación de una formulación intratecal que incluía metotrexato, ciclofosfamida y doxorubicina. Por otro lado, los menores valores de contaminación se encontraron en la CSB en la cual se utilizaba una hoja absorbente en la mesa de trabajo (CSB-3) en comparación con la CSB en la que se trabajaba directamente sobre la superficie de acero inoxidable (CSB-2). Sin embargo, no se puede afirmar con seguridad que el uso de una hoja absorbente permita reducir la contaminación, dado que se desconoce la carga de trabajo de cada CSB. Asimismo, tampoco se pueden realizar comparaciones entre ambos Servicios de Farmacia debido a la elaboración de diferentes tipos de preparaciones (el Área de Farmacia del Servicio de Oncología elabora mayoritariamente formulaciones de tipo citostático, mientras que en el Servicio de Oncología se preparan también formulaciones de tipo antineoplásico con anticuerpos monoclonales, inhibidores de proteasoma, e incluso inmunosupresores. En relación a los baños de la sala de administración, en dos de ellos se recogieron muestras tras la limpieza y otro se muestreó antes y después de la misma, asegurándose en todos los casos de que no entrase ningún paciente tras la limpieza. Sin embargo, a pesar de que la limpieza consigue reducir los niveles de contaminación, todavía quedaban restos de fármacos en la tapa del inodoro y en el suelo.

También se encontraron restos de citostáticos en la superficie exterior del contenedor de residuos de la CSB (ciclofosfamida= 0,51 ng) y en la cara exterior de los filtros HEPA de la CSB (gemcitabina= 333,42 ng; irinotecán= 39,3 ng; ciclofosfamida= 6230,37 ng; paclitaxel= 5,24 ng). Estos resultados se expresan en cantidad debido a que no se conoce el área muestreada.

No se han realizado correcciones de las concentraciones según los porcentajes de recuperación obtenidos para cada compuesto, por lo que los valores reales de contaminación serán mayores, dado que la recuperación osciló entre el 10,8% y el 75%.

En general, los resultados obtenidos muestran la presencia de contaminación por alguno de los fármacos citostáticos monitorizados en alguna de las superficies muestreadas. Esta contaminación no solo se limitó estrictamente a las áreas de trabajo tales como las salas de preparación y el

material que en ellas se encuentra como las CSB, cajetines, carros, encimeras, suelos y viales. Además, se encontraron residuos en zonas adyacentes como la mesa de documentación, donde se reciben y almacenan las hojas de pedido, las cuales pasan al interior de la sala de preparación, el teclado del ordenador, y los pasillos exteriores próximos a la puerta de entrada a las salas de elaboración. A pesar de la existencia de una antesala en el Servicio de Farmacia del Área de Oncología, donde se dispone de los EPIs necesarios para vestir al entrar en la sala (gorro y calzas) y donde se desechan una vez que se desea salir, se detectó la presencia de gemcitabina y ciclofosfamida en el suelo de la antesala, y de ciclofosfamida en el suelo en el exterior de la antesala, lo que indica la posible expansión de estos agentes hacia otras zonas no directamente implicadas en la manipulación de estos fármacos. Esto puede ser debido a un uso inadecuado de las calzas. Esta situación también se produce en el Servicio de Farmacia del Área de Farmacia en la cual no se dispone de antesala. Asimismo, la existencia de contaminación en la mesa de documentación y en el teclado del ordenador evidencia un arrastre desde la zona de manipulación, que puede ser debido a una mala práctica en el uso de los EPIs utilizados en la sala de elaboración, con la consiguiente posible exposición y mayor riesgo por parte del personal que ahí se encuentra puesto que no utilizan medidas de protección.

El mayor porcentaje de positivos en muestras de superficies fue debido a ciclofosfamida (47,3%), aunque no fue de los compuestos con mayor número de preparaciones. Sin embargo, su bajo LOD (5 pg/cm<sup>2</sup>) junto con la gran cantidad de fármaco preparado a lo largo de la semana (21,451 mg) pudieron haber contribuido a la alta carga de muestras positivas.

Por otro lado, cabe destacar la presencia de restos de citostáticos en los viales comerciales e incluso la existencia de contaminación cruzada. Esta situación puede ser la responsable o contribuir a la carga de contaminación generada en las salas de elaboración. Además, este hecho puede exponer a otros trabajadores que no cuentan con las medidas de protección adecuadas, como por ejemplo los trabajadores encargados de la recepción de estos fármacos y su distribución a los Servicios de Farmacia. Del mismo modo, también se detectó contaminación en los blísteres de comprimidos de ciclofosfamida y etopósido dispensados en la consulta de Farmacia.

Con respecto a las salas de administración, se detectó contaminación en las pantallas de las bombas de perfusión, en el suelo debajo de las bombas y

en los sillones de los pacientes tras la infusión del correspondiente tratamiento antineoplásico. Los baños de los pacientes y el suelo alrededor del inodoro fueron superficies altamente contaminadas, detectándose múltiples compuestos simultáneamente. Además, tras la limpieza y desinfección de los baños, la presencia de algunos citostáticos continuó siendo elevada.

Por otro lado, con respecto a las muestras tomadas de los antebrazos de los participantes mediante un brazalete que incorporaba el tejido de muestreo, se obtuvieron 82 muestras, las cuales corresponden únicamente a la tercera campaña de monitorización. Todos los participantes llevaron el brazalete al descubierto sin cubrir por ninguna prenda de ropa ni indumentaria del hospital, a excepción de los trabajadores de CSB que llevaron el brazalete cubierto por una bata desechable los días 1 y 2 de muestreo (fase 3 y 4), pero el día 3 (fase 5) colocaron el brazalete por el exterior de la bata.

Todos los tejidos incorporados en los brazaletes fueron negativos a excepción de 2 muestras pertenecientes a trabajadores de la CSB, los cuales presentaron contaminación por ciclofosfamida a concentraciones de 7,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 31,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Estos brazaletes corresponden a muestras recogidas en la fase 5, en la cual estos trabajadores colocaron el brazalete por encima de la bata. Por tanto, dado que entraban y salían repetidamente de la sala de preparación, esta contaminación pudo deberse al hecho de retirar y colocar de nuevo el brazalete, posiblemente con guantes contaminados, por lo que esta contaminación no puede atribuirse exclusivamente a otros fenómenos como fugas o formación de aerosoles durante la preparación de las formulaciones, o depósito desde el aire de la sala.

Otros autores también han detectado contaminación por citostáticos tanto en áreas de farmacia, donde se realiza la preparación de formulaciones, como en las salas de administración y las habitaciones de los pacientes [174; 177; 212; 219; 221; 245; 251; 256; 293]. Las zonas más frecuentemente contaminadas de las áreas de preparación incluyen las distintas superficies de trabajo como la CSB (bandeja de trabajo, ventana, pared posterior, pared superior próxima al filtro HEPA, superficie debajo de la hoja absorbente), suelos debajo de la CSB y en el exterior de la sala de preparación, cajoneras de almacenamiento, estanterías, encimeras, carros, bandejas, mesas, contenedores de residuos, pomos de puertas y neveras, y

grifos [198; 204; 210; 232; 236; 256; 265; 266; 284; 297], entre otras, así como objetos como lápices, calculadora, teléfono, ratón y teclado del ordenador [255; 265; 289; 294; 295; 297; 430], o viales comerciales, embalaje y bolsas I.V. tras su preparación [180; 219; 221; 249; 251; 258; 261]. Las superficies contaminadas en el área de administración a pacientes ambulatorios incluyen el mostrador de enfermería, las pantallas de las bombas de infusión, el soporte de las bombas, el suelo debajo de las bombas, los sillones de administración, las balanzas y los baños [174; 207; 210; 219; 250; 264; 266; 284]. Asimismo, en las habitaciones de pacientes ingresados también se detectó presencia de fármacos citostáticos en los suelos, mesita de noche, papelería y en los baños [210; 212; 224; 254; 431]. Además, Fransman et al. (2004, 2005) [269; 272] detectaron la presencia de ciclofosfamida en sábanas, toallas y agua usada para asear a los pacientes por lo que el cuidado de los pacientes también entraña un cierto riesgo, no solo derivado de la preparación o administración de los fármacos, sino también por la manipulación de materiales en contacto con fluidos de los pacientes como orina, heces, vómitos y sudor [201], ya que algunas de estas tareas se realizan a menudo sin el uso de guantes. De hecho, Koller et al. (2018) [234] detectaron la presencia de ciclofosfamida en muestras recogidas mediante la limpieza de la piel de pacientes tras 4 y 24 horas después de la administración del tratamiento, incluso en mayores concentraciones que las detectadas en superficies. Por consiguiente, esta contaminación puede extenderse a otros ámbitos como lavanderías industriales [267] y afectar a los trabajadores que manipulan este material contaminado [73], o incluso poner en riesgo a los familiares, puesto que también se han detectado restos de fármacos (ciclofosfamida, 5-fluorouracilo y platino) en muestras de superficies de baños y cocinas en las casas de pacientes que han recibido tratamiento con esos compuestos [292].

Los fármacos más frecuentemente detectados en los trabajos publicados fueron ciclofosfamida, ifosfamida, 5-fluorouracilo, metotrexato, compuestos de platino, gemcitabina y paclitaxel, dado que son también los compuestos más monitorizados. Otros fármacos detectados fueron etopósido, dacarbazina, irinotecán, topotecán, docetaxel, vinorelbina, vincristina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, citrabina, mitomicina C e incluso un antiviral (ganciclovir).

En relación con la localización de la contaminación, algunos trabajos han detectado mayor nivel de contaminación [72; 75; 245] o mayor porcentaje de muestras positivas [294] en áreas de enfermería que en las zonas de preparación, lo que indica que la exposición puede estar más relacionada con las prácticas de trabajo y la concienciación de los trabajadores que con el manejo directo de estos fármacos. De hecho, algunos trabajos indican la ausencia de correlación entre la cantidad de fármaco manejado y/o el número de preparaciones realizadas con la frecuencia y el nivel de contaminación hallado [72; 236; 238; 239; 255; 266; 279; 284; 294; 295]. Por el contrario, Connor et al. (2010) [212] encontraron asociación entre el manejo de paclitaxel y la concentración media detectada en superficies, pero no entre el manejo y la frecuencia de resultados positivos. Por su parte, Odraska et al. (2014) [246] también encontraron una asociación significativa entre el nivel de contaminación y la carga de trabajo. Asimismo, Hedmer et al. (2008) [210] y Yoshida et al. (2011) [220] correlacionaron el nivel de contaminación con la cantidad de fármaco manejado, y las investigaciones realizadas en hospitales canadienses revelaron una relación significativa entre el nivel de contaminación de ciclofosfamida con el número de preparaciones y la cantidad manejada anualmente [174; 180; 251; 252].

Se ha observado contaminación en superficies desde los primeros trabajos publicados por Sessink et al. en la década de 1990 [192; 193] hasta en los trabajos publicados recientemente [232; 234; 257; 265; 296], lo que indica la existencia de un riesgo de exposición a pesar de las medidas y sistemas de seguridad y protección implantados, y la elaboración de guías, protocolos y recomendaciones para el manejo seguro de fármacos antineoplásicos, aunque algunos autores no encontraron resultados positivos [71]. Por tanto, dado que en algunos casos la contaminación no se correlaciona con el volumen de manejo de fármacos, esto sugiere la existencia de diferencias en el uso de las medidas aplicadas en los distintos hospitales como la utilización correcta de EPIs, el uso de CSB de flujo laminar vertical o aisladores, los sistemas Luer-lock, y los dispositivos de transferencia de fármacos de sistema cerrado (CSDTD, por sus siglas en inglés) entre los que se encuentran dispositivos comerciales como Phaseal®, Equashield® y Chemoclave® [160], para evitar la formación de aerosoles y fugas durante la preparación de las formulaciones, u otras técnicas como la retirada de los embalajes y la limpieza de viales.

Las encuestas realizadas a los trabajadores indican un alto uso de guantes, menor uso de doble guante y bata, y bajo uso de máscara o gafas [75; 220; 432-438], aunque en algunos casos los guantes usados no eran específicos para agentes antineoplásicos [104; 433]. Además, su uso también varía en función de la tarea a realizar (preparación, administración y eliminación de residuos) [75; 438] y la categoría profesional de que se trate (farmacéuticos, técnicos de farmacia, enfermeros, recepción, transporte) [439]. Algunos factores como el clima de seguridad en el trabajo, la percepción del riesgo y de la eficacia de las medidas, y la influencia interpersonal afectan al uso de los EPIs [75]. Este conocimiento y percepción del riesgo varía en función de la categoría profesional, siendo por lo general mayor en aquellas que realizan un manejo directo de los fármacos (farmacéuticos, técnicos de farmacia y enfermeros) [439]. Sin embargo, otros factores como los años de experiencia o el nivel educativo no mostraron diferencias significativas [75; 433]. Otras investigaciones revelaron un alto uso de guantes y máscara, próximo al 100%, al llevar a cabo actividades de preparación, limpieza, cambio de contenedores de residuos y eliminación de desechos, y en menor medida para las actividades de administración [94]. También se ha visto que a pesar de la publicación de guías y recomendaciones por distintas organizaciones, en algunas instituciones no disponen de protocolos de trabajo, no han recibido cursos de formación específicos sobre la manipulación de citostáticos, y no presentan un programa de vigilancia de la salud [104]. En algunas encuestas se ha visto que a pesar de que los trabajadores han recibido cursos de formación, en la mayoría de los casos no ha tenido lugar en los últimos 12 meses, como es recomendable [434-436]. También se han descrito actividades no recomendadas como tocar las pantallas de las bombas de infusión y otros objetos como lápices y bolígrafos, pomos de puertas y neveras, calculadoras, ordenadores y ficheros o carpetas con guantes contaminados [434; 435; 437], lo que se refleja en la presencia de resultados positivos en dichas superficies. Estas encuestas también han permitido evaluar la aplicación de otras medidas como el uso de CSDTD, conexiones Luer-lock, sistemas sin aguja y papel absorbente en los sitios de preparación, así como la utilización de CSB o aisladores [434-436; 438]. Por lo general, el uso de sistemas sin aguja y sistemas Luer-lock está ampliamente extendido, a diferencia de los CSDTD, los cuales no son utilizados en algunos hospitales [225; 240; 255; 270; 273], y en porcentaje variable en cuanto a la utilización de las CSB o los aisladores.

Diferentes trabajos han evaluado la eficacia de los sistemas CSDTD antes y varios meses después de su implantación en la práctica habitual para la elaboración de formulaciones, obteniendo una reducción en el porcentaje de muestras positivas y en los niveles de contaminación detectados [203; 209; 222; 268; 281; 282; 287; 440]. Por su parte, Spivey & Connor (2003) [441] compararon la técnica convencional con el uso de CSDTD, utilizando fluoresceína como marcador de exposición, y observaron contaminación en múltiples superficies y objetos con la técnica estándar, mientras que el nuevo sistema CSDTD no produjo fugas en ninguna etapa de manipulación. Además, Gómez-Álvarez et al. (2016) [442] observaron también un descenso de la contaminación con el uso de CSDTD en comparación con la técnica estándar en viales, jeringa y preparación final, mientras que no detectaron fluoresceína en guantes y mesa de trabajo con ninguna de las técnicas utilizadas. Sin embargo, la eliminación de la contaminación por compuestos citostáticos no fue completa dado que todavía se detectaban niveles de los fármacos, lo que sugiere que estas medidas no son suficientes para evitar la contaminación de los lugares de trabajo. Este hecho se pone de manifiesto en estudios en los que se ha observado la presencia de bajos niveles de fármacos o su ausencia en hospitales en los cuales no se utilizaron CSDTD, de manera similar a aquellos en los que sí se utilizaron [174; 212; 219; 220], lo que indica que una sola medida no es suficiente para garantizar la completa protección, que dicha protección puede lograrse mediante la aplicación de otras prácticas y que no depende de una sola medida, sino de la conjunción de múltiples factores (personales y organizativos) [438].

Las CSB son una de las barreras mecánicas más utilizadas para la elaboración de formulaciones de fármacos peligrosos, aunque existen diferencias en los distintos tipos de CSB utilizadas, desde las CSB de clase II tipo A1 (recirculan el 70% del aire filtrado) hasta los aisladores (sistemas totalmente cerrados que impiden el contacto directo con el exterior de la cabina y constan de una exclusiva de paso), e incluso se ha visto que en algunos casos no disponen de ellas [100]. Debido a su diseño, se considera que los aisladores proporcionan una mayor protección que las CSB [258]; sin embargo, algunos autores han detectado la presencia de fármacos citostáticos en el suelo debajo de los aisladores [205; 243; 258; 285], lo que demuestra que la protección tampoco es absoluta o que ésta podría provenir de otra fuente como los viales, ampollas o el embalaje de los fármacos.

Simon et al. (2015) [268] detectaron contaminación en el interior del aislador a pesar de utilizar un CSDTD.

La eliminación del embalaje exterior y la limpieza de viales y ampollas son recomendados por algunas organizaciones como la Asociación conjunta para la seguridad y salud en el trabajo en el sector de asuntos sociales (ASSTSAS), la Orden de Farmacéuticos de Quebec [174] y la ASHP [70], ya que numerosos estudios han detectado la presencia de residuos de fármacos citostáticos, principalmente ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo y compuestos de platino, en los viales, blísteres, embalajes e incluso en los prospectos procedentes de la industria farmacéutica [78; 193; 215; 219; 243; 254; 257-261; 263; 265; 277; 280; 282; 288; 296; 443]. Sin embargo, una serie de trabajos realizados anualmente en Canadá desde el año 2008, donde evalúan un gran número de hospitales, no encontraron diferencias significativas en los niveles de contaminación entre los hospitales que aplicaron estos procedimientos, ni tampoco entre los que usaron CSDTD, en comparación con los hospitales que no utilizaron estas medidas [174; 180; 249-253; 264]. Por otro lado, el uso de ampollas sugiere una mayor contaminación que los viales debido a la posible formación de aerosoles al romperse y al manejo de la cabeza de la ampolla una vez cortada, ya que puede, a su vez, ser fuente de contaminación [220]. Además, Kiffmeyer et al. (2013) [72] observaron una mayor contaminación cuando la limpieza se realizaba mediante spray que cuando se utilizaba un tejido humectado, por lo que la técnica de limpieza también es relevante. Por su parte, Poupeau et al. (2016) [174] proponen igualmente realizar la limpieza de los viales ya que, aunque no produce una reducción significativa, es una práctica poco costosa que podría ayudar a prevenir la exposición de aquellos trabajadores encargados de la recepción y almacenamiento de los fármacos y que habitualmente no utilizan guantes para su manipulación.

La configuración de la zona de preparación puede jugar también un papel importante en la distribución de la contaminación. Así, la existencia de salas limpias con antesala permitiría contener la contaminación, evitando su propagación a zonas adyacentes. Sin embargo, algunos investigadores, así como en presente trabajo, han detectado la presencia de fármacos en las salas adyacentes a la zona de preparación o en la antesala [176; 221; 239].

Finalmente, la efectividad de las técnicas de limpieza también ha sido cuestionada, ya que se ha detectado la contaminación de superficies tras

haber realizado la limpieza antes del muestreo [176; 192; 225; 228; 232; 241; 247; 255; 268]. Además, otros trabajos han encontrado zonas contaminadas antes de empezar las tareas de preparación al inicio del turno, lo que sugiere también una posible expansión de la contaminación [192; 219; 236]. Por su parte, Siderov et al. (2009) [239] y Hon et al. (2013) [255] no encontraron asociación entre los niveles de contaminación y la limpieza previa de las superficies.

Por tanto, según se comentó anteriormente, la aplicación de una sola medida, aunque pueda ser eficaz, resulta insuficiente para lograr la eliminación completa de la contaminación. Además, se considera que la prevención es la mejor estrategia a seguir [222; 239]. Por ello, distintos investigadores reevaluaron la contaminación tras la implantación de varias medidas como el cambio de CSB, cambio del tipo de guantes, uso de hoja desechable en la superficie de trabajo de la CSB, uso de CSDTD, limpieza de viales y ampollas, cambio del método de limpieza de superficies, el protocolo a seguir en caso de derrames, la elaboración de un manual de manejo de fármacos antineoplásicos e incluso el entrenamiento del personal, lo que permitió reducir tanto el porcentaje de muestras positivas como la cantidad encontrada en cada una de ellas [224; 232; 444]. Sin embargo, Touzin et al. (2009) [240] observaron un aumento del número de sitios contaminados y de las cantidades detectadas a pesar de la creación de una nueva área de farmacia siguiendo las recomendaciones de la ASSTSAS, por lo que la creación de una nueva infraestructura no garantiza una reducción de la exposición. Por su parte, Odraska et al. (2013) [403] observaron que todavía existía contaminación a pesar de la implantación de medidas, las cuales fueron más efectivas en el área de administración que en el área de preparación.

Finalmente, se ha visto que, junto con las distintas medidas y mecanismos utilizados para prevenir la contaminación de las zonas de trabajo, la realización de campañas periódicas de monitorización son también una medida eficaz. La participación en campañas de monitorización periódicas posee un doble objetivo, por un lado, ayuda a mantener la preocupación y concienciación de los trabajadores en relación con la exposición ocupacional y, por otro, permite evaluar la eficacia de las medidas implantadas o los cambios realizados y tomar las acciones oportunas que permitan mejorar las condiciones de exposición [174; 219; 234; 236; 252;

295]. Así, en países como Canadá, Italia, Alemania y República Checa, numerosos autores han monitorizado la evolución de la contaminación a lo largo de varios años y todos han observado un descenso en los niveles detectados y/o en el número de muestras positivas. Estos autores concluyen que las campañas de monitorización son una medida efectiva para obtener información fiable de exposición que promueve las buenas prácticas de trabajo en el manejo de fármacos antineoplásicos, contribuyendo a reducir la exposición y permitiendo evaluar la eficacia de las intervenciones realizadas [72; 174; 178; 219; 232; 246; 250; 251; 264; 294]. La OSHA, la USP y el Parlamento Europeo recomiendan la realización de evaluaciones periódicas [66; 177], mientras que en Países Bajos se publicó en 2004 una guía de carácter nacional de obligado cumplimiento que establece la obligatoriedad de la evaluación anual de superficies [176].

Por tanto, un programa de manejo seguro de fármacos antineoplásicos deberá abarcar desde la formación y entrenamiento de los trabajadores, el establecimiento de guías y protocolos de actuación, la disposición de espacios adecuados para las tareas realizadas (salas a presión negativa, antesala), y el uso de equipos de contención colectivos (CSB, aisladores, CSDTD) y medidas de protección individuales (EPIs), hasta la monitorización regular de los lugares de trabajo para lograr prevenir y contener la contaminación y reducir así el riesgo de exposición, ya que a pesar de todo, todavía se siguen detectando niveles de fármacos en los ambientes de trabajo [294-297; 445].

La USP en su capítulo 797 ha indicado un umbral máximo de 1000 pg/cm<sup>2</sup> para ciclofosfamida para limitar el riesgo de absorción en humanos [446]. Por su parte, debido a la inexistencia de límites oficiales, algunos autores han propuesto valores orientativos basados en los percentiles obtenidos del análisis de muestras reales, aunque existen diferencias en los límites propuestos, ya que algunos autores establecen valores basados en el percentil 90 o 95 [72; 176; 177; 284], mientras que Schierl et al. (2009) [238] propusieron valores basados en el percentil 50 y 75 debido a los altos niveles encontrados. Del mismo modo, también existen diferencias en el método para establecer dicho valor, ya que unos autores utilizan el valor más alto obtenido como criterio para todos los compuestos [72], mientras que otros consideran el valor medio y asignan límites distintos en función del compuesto [177; 238]. Kiffmeyer et al. (2013) [72], a diferencia

de la USP, propusieron un valor umbral más bajo de 100 pg/cm<sup>2</sup> basado en el percentil 90 del compuesto encontrado a la mayor concentración. Por otro lado, cuando se trata de compuestos de platino, dado que este metal puede estar presente en el ambiente y proceder de otras fuentes (como los gases de escape de los coches), es necesario establecer un valor que permita diferenciar la fuente de exposición [257; 292]. Sin embargo, todos estos valores son aproximaciones prácticas, ya que el establecimiento de límites de exposición ocupacionales es complejo debido a la dificultad para relacionar los valores ambientales y biológicos obtenidos con el riesgo de sufrir efectos adversos [40; 284]. Por tanto, en esos casos, el objetivo es mantener los niveles de contaminación tan bajos como sea posible, lo que se conoce como el principio ALARA (“As Low As Reasonably Achievable”), siendo por ello necesario la realización de evaluaciones periódicas [155; 174; 175; 177; 178; 293], ya que la evaluación de la exposición es el primer paso para proporcionar un ambiente de trabajo seguro para los trabajadores [447].

Sin embargo, a pesar de todo lo comentado anteriormente, la comparación directa de los resultados entre distintos estudios, o incluso entre distintos hospitales en un mismo estudio, es complicada debido a los diferentes procedimientos de muestreo empleados, los diferentes porcentajes de recuperación de los métodos utilizados, la influencia del personal que muestrea y la carga de trabajo de cada institución [246; 413; 414].

Otro tipo de muestras utilizadas con menor frecuencia en la evaluación de la exposición a fármacos antineoplásicos son los guantes empleados en las tareas de manipulación de estos compuestos, las muestras de aire ambiental, y las muestras dérmicas tomadas mediante la colocación de algún tejido sobre la superficie corporal (para evaluar el depósito desde el ambiente) o directamente muestreando la piel (para evaluar la posibilidad de contaminación cruzada como por ejemplo, tocarse la cara con guantes contaminados) o incluso mediante la recogida del líquido usado para lavar las manos. Estas muestras permiten caracterizar un poco mejor la procedencia de la exposición y la existencia de prácticas inadecuadas.

En relación a los guantes en profesionales sanitarios, todos los estudios evaluados detectaron la presencia de ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, platino y/o doxorubicina en alguna de las

muestras analizadas. Se analizaron los guantes utilizados para realizar distintas tareas como preparación, administración, manejo de viales (colocación, retirada del embalaje y limpieza del vial), manejo de orina del paciente, lavado del paciente, limpieza del baño del paciente y cambio de sábanas, detectando alguno de los fármacos monitorizados en alguna de las muestras recogidas [80; 110; 192; 193; 198; 201; 205; 207; 219; 234; 243; 245; 258; 260; 268; 269; 272; 282] e incluso en los guantes utilizados por los trabajadores de un laboratorio de investigación con fármacos citostáticos en animales [262]. Además, en algunos casos también se detectó la presencia de fármacos en la cara interna de guantes de látex, vinilo e incluso nitrilo [198; 219; 243], o en los guantes internos [219], lo que indica permeación a través de los guantes, por lo que es recomendable cambiarlos frecuentemente, por lo general, cada 30 minutos. El lavado de manos también mostró contaminación incluso tras llevar guantes en tareas de preparación, administración y cuidado de pacientes, pero no entre el personal de limpieza [110; 269; 272]. La contaminación de los guantes y las manos se evaluó también entre el personal de otras instituciones fuera del ámbito hospitalario como asistencia domiciliaria, residencias de ancianos y lavanderías, encontrándose resultados positivos en las dos primera en relación a tareas de limpieza y lavado del paciente [73]. Por su parte, Fransman et al. (2007) [267] no encontraron resultados positivos en muestras de guantes y manos de los trabajadores de una lavandería industrial que recibía ropa de 12 hospitales.

Las muestras de aire fueron tomadas mediante recolectores personales o estacionarios. Los análisis realizados por algunos autores mostraron la obtención de resultados positivos tanto en muestras de aire personales [80; 198; 205; 212; 219] como estacionarias [80; 192; 205; 219; 430] en el ámbito hospitalario y en lavanderías industriales [73], mientras que otros autores encontraron resultados negativos en ambos casos [193; 198; 220; 267; 274]. Algunos autores descartan el análisis de aire ya que consideran que no juega un papel importante en la evaluación de la exposición [221], basándose en hallazgos previos que indican un bajo porcentaje de muestras positivas a muy bajos niveles. Esto puede ser debido a la baja presión de vapor de estos compuestos a temperatura ambiente, lo que hace que su conversión a la fase gaseosa sea también baja, aunque no por ello despreciable [74; 221; 430; 448].

Dado que la vía dérmica es considerada la principal ruta de exposición a fármacos antineoplásicos [80; 175; 176; 198; 207; 233; 234; 243; 244; 262; 270; 273; 402; 449], numerosos trabajos han evaluado la contaminación de manos, brazos, piernas, pecho, espalda y frente, bien muestreando directamente sobre la superficie corporal (principalmente en manos y frente) [269-271; 273; 297], o mediante la colocación de algún tejido recolector, tanto directamente sobre la piel como en la superficie externa o interna de los EPIs [133; 198; 216; 219; 221; 269; 272]. En todos ellos, los resultados obtenidos muestran la presencia de alguno de los compuestos evaluados (ciclofosfamida, ifosfamida, gemcitabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, citarabina y compuestos de platino) en muestras pertenecientes a diferentes trabajadores (farmacéuticos, técnicos, enfermeros y personal de limpieza), implicados en distintas tareas (preparación, administración, cuidado del paciente, transporte). Además, Hirst et al. (1984) [190] han demostrado la presencia de ciclofosfamida en la orina de voluntarios tras la exposición dérmica, lo que indica que la vía dérmica constituye una importante vía de exposición. Por su parte, Odraska et al. (2011) [450], utilizando un modelo experimental de epidermis humana y mucosa oral, han observado el paso de 4 compuestos (ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, cisplatino y doxorubicina) a través de estos tejidos, siendo los 2 primeros los que penetraron más eficientemente. Por tanto, la vía dérmica constituye una importante ruta de entrada de estos fármacos en el organismo, por lo que sin un adecuado uso de los EPIs se producirá un mayor riesgo de exposición ocupacional. Además, como norma general, se asume que la absorción dérmica se produce en mayor medida en compuestos de peso molecular menor de 500 Dalton y, dado que la mayoría de fármacos citostáticos clásicos son moléculas relativamente pequeñas, puede producirse captación dérmica desde superficies contaminadas, por lo que el uso de EPIs, principalmente guantes, es fundamental [175; 177; 232; 451-454].



**V. PARTE EXPERIMENTAL (2). DETERMINACIÓN DE  
FÁRMACOS CITOSTÁTICOS EN ORINA DE  
TRABAJADORES EXPUESTOS MEDIANTE UPLC-MS/MS**



## **5.1. Material y métodos**

### **5.1.1. Instrumentación y material de laboratorio**

#### **5.1.1.1. LC-MS/MS**

La separación cromatográfica se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC® H-Class equipado con una bomba cuaternaria, un sistema desgasificador de 5 canales, un inyector automático de muestras con control de temperaturas entre 4°C y 40°C, y un sistema de inyección tipo XYZ de alta precisión que permite la inyección de volúmenes entre 0,1-10 µL, y un horno de columna con control de temperatura desde ambiente hasta 60°C (Waters Corporation. Milford, MA, EE.UU.)

El sistema de detección empleado consistió en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo® TQ-XS equipado con una fuente de ionización dual ESI/APCI (Electrospray Ionization/Atmospheric Pressure Chemical Ionization) y US (UniSpray), y un sistema de vacío compuesto por dos bombas turbomoleculares y una bomba rotatoria externa de apoyo (Waters Corporation).

Se utilizó el software MassLynx V4.2 para el control del sistema UPLC®-MS/MS y la adquisición de datos, y el software TargetLynx XS para el procesamiento de los datos (Waters Corporation).

#### **5.1.1.2. Instrumentación adicional**

- Manifold de 20 posiciones para la extracción en fase sólida (SPE) (Waters Corporation)
- Robot automatizado SPE GX-274 Aspec (Gilson International, Madrid, España)
- Bomba de vacío de membrana GM-0.5 (COMECTA S.A., Barcelona, España)
- Agitador magnético OVAN MBG50E (Suministros Grupos Esper S.L., Barcelona, España)
- Balanza analítica Sartorius LE244S (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Campana de extracción CRUMA 870 (Cruma, Barcelona, España)

- Baño termostatzado evaporador con suministro de nitrógeno TurboVap LV (Zymark, Hopkinton, MA, Estados Unidos)
- Centrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- Sistema de purificación de agua Mili-Q (Milipore, Burlington, MA, Estados Unidos)

### **5.1.1.3. Material de laboratorio**

#### **5.1.1.3.1. Material volumétrico**

- Pipetas automáticas Eppendorf® de 20, 25, 50, 100, 200, 1000, 5000 y 10000 µL (Eppendorf)
- Probetas de 50, 100, 250 y 500 mL (Scharlab S.L., Barcelona, España)
- Matraces aforados de 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 y 2000 mL (Scharlab S.L.)
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (Scharlab S.L.)

#### **5.1.1.3.2. Material fungible**

- Columna cromatográfica Cortecs® T3 (100 x 2,1 mm, 1,6 µm) (Waters Corporation)
- Botes de cristal ámbar de 1,5 mL para almacenamiento de disoluciones (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos)
- Botes de cristal ámbar de 8 mL para almacenamiento de disoluciones (ThermoFisher Scientific)
- Tubos de ensayo de 5 mL de fondo redondo (12 x 75 mm) (Labbox Labware S.L., Barcelona, España)
- Tubos de ensayo de 3 mL de fondo redondo (12 x 50 mm) (Normax Lda., Marinha Grande, Portugal)
- Viales de inyección de 12 x 32 mm con tapa pre-rajada Screw Cap Lectra Bond PTFE/Silicone (Waters Corporation)
- Insertos de 150 µL para viales de inyección (Waters Corporation)

- Puntas de pipeta de 200, 1000, 5000 y 10000  $\mu\text{L}$  (Deltalab S.L., Barcelona, España)
- Tubos de polipropileno de 12 mL (15 x 102 mm), tapado, con faldón (Deltalab S.L.)
- Frascos de orina de polipropileno de 150 mL (58 x 72 mm) (Scharlab S.L.)
- Cartuchos de extracción en fase sólida Oasis<sup>®</sup> HLB 3 cc 60 mg (Waters Corporation)
- Cartuchos de extracción en fase sólida MCX 3 cc (Teknokroma, Barcelona, España)

### **5.1.2. Disoluciones**

En este apartado se incluyen específicamente las disoluciones utilizadas para el desarrollo del método analítico en orina, dado que todos los demás disolventes, reactivos y sustancias patrón utilizados ya han sido descritos en el apartado 4.1.2 del capítulo IV.

#### **5.1.2.1. Preparación de disoluciones de trabajo de citostáticos**

Las disoluciones madres de citostáticos empleadas en esta metodología fueron las mismas que las descritas en el Capítulo IV.

Partiendo de la disolución madre de cada compuesto se elaboraron disoluciones de stock diferentes para la elaboración de los calibradores y de las muestras QC. Ambas disoluciones se prepararon a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para dacarbazina, metotrexato, doxorubicinol, irinotecán, ciclofosfamida, doxorubicina, epirubicina, vinorelbina y paclitaxel (Grupo A), y de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para gemcitabina y docetaxel (Grupo B).

La preparación de los distintos calibradores a partir de la disolución de stock correspondiente se realizó mediante la elaboración de disoluciones de trabajo a 20; 15; 10; 4; 2; 1; 0,4 y 0,2  $\text{ng}/\text{mL}$  para el grupo A; y a 100; 75; 50; 20; 10; 5; 2 y 1  $\text{ng}/\text{mL}$  para el grupo B. La disolución de stock para las muestras QC se diluyó para preparar disoluciones de trabajo a 15; 5; y 3 o 0,6  $\text{ng}/\text{mL}$ , para los compuestos del grupo A; y a 75; 25; 15 o 3  $\text{pg}/\text{mL}$  para los compuestos del grupo B.

A partir de las disoluciones madre de los PI se elaboraron dos disoluciones de stock independientes a 10 µg/mL conteniendo una de ellas los PI correspondientes a los compuestos del grupo A (dacarbazina-d6, metotrexato-d3, irinotecán-d10 y ciclofosfamida-d4) (disolución A) y otra con los PI correspondientes a los compuestos del grupo B (vinorelbina-d3 y paclitaxel-d5) (disolución B). A partir de estas disoluciones de stock se preparó una disolución de trabajo combinada con todos los PI a 2 ng/mL para el grupo A, y 10 ng/mL para el grupo B.

### **5.1.2.2. Preparación de disoluciones de optimización**

A partir de la disolución madre de cada compuesto se prepararon disoluciones de optimización a 100 ng/mL en disolución de reconstitución.

### **5.1.3. Metodología analítica**

#### **5.1.3.1. Preparación de recta de calibrado y muestras QC**

La elaboración de los calibradores se realizó mediante la adición de 50 µL de la correspondiente disolución de trabajo en 1 mL de orina para preparar calibradores a 1000, 750, 500, 200, 100, 50, 20 y 10 pg/mL para los compuestos del grupo A; y a 5000, 3750, 2500, 1000, 500, 250, 100 y 50 pg/mL para los compuestos del grupo B. Del mismo modo, la preparación de las muestras QC se realizó añadiendo 50 µL de la disolución de trabajo correspondiente en 1 mL de orina para obtener concentraciones de 750, 250 y 150/30 pg/mL para el grupo A; y 3750, 1250, 750/150 pg/mL para el grupo B. Tanto a los calibradores y muestras QC como a las muestras reales (1 mL) se les añadieron 50 µL de la disolución de trabajo de PI.

#### **5.1.3.2. Procedimiento de extracción**

La determinación de todos los analitos incluidos en la metodología requirió la aplicación de dos procedimientos distintos de extracción en fase sólida (SPE), por lo que fue necesario la extracción de las muestras por duplicado.

##### **5.1.3.2.1. SPE con cartuchos Oasis® HLB**

La determinación de metotrexato, ciclofosfamida, docetaxel y paclitaxel se realizó mediante la extracción de la muestra (1 mL) utilizando cartuchos de fase reversa Oasis® HLB, y el siguiente protocolo de extracción:

Los cartuchos se acondicionaron inicialmente con 2 mL de metanol y con 2 mL de agua. A continuación se cargaron las muestras, acondicionadas previamente con 2 mL de ácido fórmico 10%, para realizar posteriormente el lavado de los cartuchos con 2 mL de agua:metanol (70:30, v/v). Tras el secado de los cartuchos mediante la aplicación de vacío durante 10 minutos, los analitos de interés se eluyeron con 3 mL de diclorometano:isopropanol (DCM:IPA) (75:25, v/v). Tras evaporar el disolvente de elución, los extractos secos se reconstituyeron con 100  $\mu$ L de disolución de reconstitución (ácido fórmico:ACN 90:10, v/v), se agitaron en vórtex unos segundos, se centrifugaron en inserto en MiniSpin 10 minutos a 14.500 rpm y se trasvasaron los insertos a su correspondiente vial de inyección para su posterior análisis mediante UPLC<sup>®</sup>-MS/MS. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L.

#### **5.1.3.2.2. SPE con cartuchos MCX**

La determinación de gemcitabina, dacarbazina, doxorubicinol, irinotecán, doxorubicina, epirubicina y vinorelbina se realizó mediante la extracción de la muestra (1 mL) utilizando cartuchos mixtos de fase reversa e intercambio catiónico MCX, y el siguiente protocolo de extracción:

Los cartuchos se acondicionaron inicialmente con 2 mL de metanol y con 2 mL de agua. A continuación se cargaron las muestras, acondicionadas previamente con 2 mL de ácido fórmico 10%, para realizar posteriormente dos etapas de lavado de los cartuchos, la primera con 2 mL de ácido fórmico 10% seguida de otro lavado con 2 mL de metanol. Tras el secado de los cartuchos mediante la aplicación de vacío durante 10 minutos, los analitos de interés se eluyeron con 3 mL DCM:IPA:NH<sub>3</sub> (70:25:5, v/v/v). Tras evaporar el disolvente de elución, los extractos secos se reconstituyeron con 100  $\mu$ L de disolución de reconstitución, se agitaron en vórtex unos segundos, se centrifugaron en inserto en MiniSpin 10 minutos a 14.5000 rpm y se trasvasaron los insertos al vial de inyección, inyectando 10  $\mu$ L en el equipo de UPLC<sup>®</sup>-MS/MS.

#### **5.1.3.3. Condiciones cromatográficas**

La separación cromatográfica de todos los compuestos se realizó en fase reversa empleando una columna analítica Cortecs<sup>®</sup> T3 (100 x 2,1 mm; 1,6  $\mu$ m). La fase móvil utilizada consistió en una mezcla binaria de ácido fórmico 0,1% en agua y ACN a un flujo de 0,3 mL/min, manteniendo la

columna a 30°C. El gradiente empleado en la separación se muestra en la **Tabla 20**. El cambio de proporción de disolvente A y B a los porcentajes indicados a cada tiempo se realizó de forma progresiva.

**Tabla 20:** Método cromatográfico para la separación de 11 compuestos citostáticos en orina.

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
1	95	5
6	74	26
9	74	26
10	60	40
11	30	70
12	0	100
12,1	95	5
15	95	5

#### 5.1.3.4. Condiciones de espectrometría de masas

La detección de los analitos se realizó utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo® TQ-XS. El modo de ionización seleccionado fue electrospray en modo positivo positivo (ESI+) y el modo de trabajo MRM.

Fue necesario nuevamente la optimización de los parámetros de cada compuesto, por lo que se efectuó la infusión de disoluciones combinadas conteniendo un máximo de 4 compuestos a 100 µg/mL cada uno, para determinar las transiciones características para cada analito, así como los valores óptimos de voltaje capilar, voltaje de cono, y energía de colisión para cada uno de ellos. El único requisito para la optimización simultánea de varios compuestos es que la diferencia de masas entre ellos sea superior a 10 uma. La **Tabla 21** recoge los valores óptimos de los parámetros del espectrómetro de masas.

**Tabla 21:** Valores seleccionados de los parámetros del espectrómetro de masas.

Parámetros de la fuente (ESI+)		Parámetros de los analizadores y de la celda de colisión	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Voltaje de capilar	1 kV	Low Mass Resolution 1	2,73
Voltaje de cono	Variable	High Mass Resolution 1	15,09
Tª de la fuente	150 °C	Ion Energy 1	0,5 V
Tª de desolvatación	600 °C	Voltaje entrada celda colisión	1 V
Flujo de gas de desolvatación	1000 L/h	Voltaje salida celda de colisión	1 V
Flujo de gas de cono	300 L/h	Low Mass Resolution 2	2,73
		High Mass Resolution 2	15,04
		Ion Energy 2	0,8 V
		Multiplificador	518 V
		Presión Argón en celda de colisión	2,24e <sup>-004</sup>

#### 5.1.4. Validación del método en orina

La validación del método se realizó de la forma descrita en el Capítulo IV. La **Tabla 22** recoge los parámetros evaluados en la metodología desarrollada en muestras de orina, los experimentos realizados y los criterios de aceptación para cada uno de ellos.



**Tabla 22:** Parámetros de validación evaluados, experimentos realizados y criterios de aceptación en muestras de orina.

Parámetro	Experimento	Criterio de aceptación
Selectividad	Análisis de 10 muestras blanco (distinta procedencia) fortificadas con PI	Ausencia de interferencias
Especificidad	Muestras fortificadas con distintos fármacos y drogas de abuso	Ausencia de interferencias
Linealidad	5 curvas de calibración elaboradas en días diferentes (n= 5) 6-8 niveles de calibración	$r^2 \geq 0,99$ Residual $\pm 20\%$
Límite de detección	Muestras fortificadas al LOD evaluado (n=3) en 3 días distintos (n=9)	Detección de las 2 transiciones Relación S/N >3 lón ratio adecuado* $T_R \pm 0,2$ min con respecto al de calibradores
Límite de cuantificación	Muestras fortificadas al LOQ evaluado (n=3) en 3 días distintos (n=9)	$\%CV \leq 20\%$ y MRE $\pm 20\%$
Exactitud y Precisión	Muestras fortificadas a QC bajo, medio y alto (n=3 para cada concentración) en 5 días diferentes (n=15)	$\%CV \leq 20\%$ y MRE $\pm 20\%$
Efecto matriz	Muestras a QC bajo y alto comparando el área del pico del analito en muestras blanco fortificadas tras la extracción (n=10) con el área del pico del analito en muestras preparadas en el disolvente de reconstitución ("neat") (n=5)	-

Rendimiento de extracción	Muestras a QC bajo y alto comparando el área del pico del analito en muestras fortificadas antes de la extracción (n=5) con muestras fortificadas tras la extracción (n=10)	-
Eficiencia del proceso	Muestras a QC bajo y alto comparando el área del pico del analito en muestras fortificadas antes de la extracción (n=5) con muestras preparadas en el disolvente de reconstitución (n=5)	-
Estabilidad a corto plazo en "autosampler"	Muestras a QC bajo, medio y alto comparando concentraciones en muestras frescas (n=3) con las obtenidas en muestras procesadas y conservadas durante 72 horas en "autosampler" a 6°C	QCs ±20% comparados con muestras QC frescas
Estabilidad a largo plazo	Muestras a QC bajo y alto comparando las concentraciones en muestras frescas (n=3) con las obtenidas en muestras sin procesar almacenadas en congelador a -22°C durante 2 meses	QCs ±20% comparados con muestras QC frescas
Estabilidad congelación/descongelación (F/T)	Muestras a QC bajo y alto comparando las concentraciones en muestras frescas (n=3) con las obtenidas en muestras tras 3 ciclos F/T	QCs ±20% comparados con muestras QC frescas

\*Directiva del Consejo 96/23/EC [411]

### 5.1.5. Aplicación a muestras reales

La metodología desarrollada y descrita en este capítulo fue aplicada para la determinación de 11 compuestos citostáticos en orina de trabajadores sanitarios y demás personal en contacto, directo o indirecto, con estos fármacos. Las muestras de orina se recogieron antes y después del turno de trabajo en 3 días no consecutivos durante la última campaña de monitorización (fase 3, 4 y 5), en los mismos días en los que también se recogieron los brazaletes y las muestras de superficies. Dos semanas antes del inicio de la recogida de muestras se informó al personal acerca de las características del estudio (objetivos, metodología y cronograma), se hizo entrega de la hoja de información y se solicitó su consentimiento por escrito para participar en el estudio (**Anexos 1 y 2**). Se entregó también un cuestionario individual (**Anexo 3**) donde se recoge información demográfica y relacionada con la experiencia profesional (años de experiencia total, años en el puesto actual, actividad desarrollada, formación específica, uso de EPIs, incidencias, cantidad de fármacos y número de preparaciones realizadas). Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G) (**Anexo 4**).

Las muestras de orina fueron recogidas por los trabajadores de los Servicios de Farmacia y Oncología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela antes del inicio y tras finalizar el turno de trabajo durante 3 días no consecutivos pertenecientes a la misma semana. Las muestras se almacenaron refrigeradas hasta acabar el turno. Al finalizar el turno las muestras se llevaron al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la USC, donde fueron almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

Además, también se recogieron muestras de orina de pacientes que recibieron tratamiento con alguno de los fármacos incluidos en la metodología. Con el objetivo de verificar el método analítico, se seleccionaron aquellos pacientes que estaban recibiendo tratamiento durante alguno de los tres días que duró esta campaña de muestreo, informándolos acerca de las características del estudio. Del mismo modo, se hizo entrega de la hoja de información (**Anexo 5**), se solicitó su consentimiento por escrito (**Anexo 6**) y se recogió una muestra de orina al finalizar el ciclo de administración. Las muestras de orina de los pacientes fueron tratadas del mismo modo que las muestras de los trabajadores.

## 5.2. Resultados y Discusión

### 5.2.1. Procedimiento de extracción

Se evaluaron 3 metodologías diferentes de extracción: una modificación de la técnica “*dilute and shot*” (diluir e inyectar) en la que previamente se realizó la precipitación de proteínas con ACN frío; extracciones líquido-líquido (LLE) con disolventes orgánicos como acetato de etilo o dietiléter tanto en medio ácido como en medio básico; y SPE con distintos cartuchos de extracción. Los mejores resultados se obtuvieron con la SPE, dado que la LLE permitió detectar ciclofosfamida, docetaxel y paclitaxel en niveles comparables a la SPE, pero no el resto de los analitos. Se evaluaron distintos tipos de cartuchos de SPE con diferentes mecanismos de interacción, como los cartuchos de fase reversa HLB, así como los cartuchos de modo mixto de fase reversa e intercambio catiónico MCX, para la retención de compuestos básicos, o de modo mixto de fase reversa e intercambio aniónico MAX, para la retención de compuestos ácidos, acondicionando la muestra a diferentes valores de pH. Solo con cartuchos HLB y MCX se obtuvieron valores óptimos para muchos de los compuestos, aunque no para su totalidad. Los 11 compuestos citostáticos objeto de estudio pertenecen a distintas familias, con distintas estructuras químicas y diferentes propiedades fisicoquímicas. Dado que un solo tipo de cartucho de extracción no recogía eficazmente todos los compuestos y muchos de ellos se perdían en el lavado o incluso en la carga, se evaluó además la realización de la extracción HLB y MCX en serie (es decir, aplicar la carga y el lavado de HLB sobre MCX o viceversa) o de manera independiente (se realiza un tipo de extracción u otra en función del compuesto), y se probaron también distintas disoluciones de lavado para HLB (agua:metanol 80:20; 70:30 y 50:50 (v/v) y distintas disoluciones de elución para MCX (metanol:NH<sub>3</sub> 95:5 v/v; DCM:IPA:NH<sub>3</sub> 70:25:5 v/v/v). Los mejores resultados se obtuvieron realizando una etapa de lavado con agua:metanol (70:30, v/v) (para HLB) y la elución con DCM:IPA:NH<sub>3</sub> (70:25:5, v/v/v) (para MCX), y realizando ambas extracciones de manera independiente para poder alcanzar los niveles de sensibilidad requeridos, ya que su combinación resultó en un aumento del ruido sin una mejora de la señal analítica. La realización de una etapa previa de precipitación de proteínas con ACN frío antes de la SPE no aportó ningún beneficio, por lo que fue descartada. Esto puede explicarse por el hecho de que, en un individuo sano, la orina es una matriz con bajo contenido en proteínas.

### 5.2.1.1. Extracción HLB

Los cartuchos Oasis® HLB utilizan un relleno de fase reversa que proporciona un balance hidrofilia-lipofilia equilibrado para compuestos ácidos, básicos y neutros.

El acondicionamiento de la muestra (1 mL) en medio ácido con 2 mL de ácido fórmico 10% en agua (pH 2) resultó más favorable que en medio básico utilizando tampón borato (pH 9). Se optimizó el disolvente de lavado, siendo de elección un volumen de 2 mL de agua:metanol (70:30, v/v), y la elución con 3 mL de DCM:IPA (75:25, v/v) frente a metanol.

Este tipo de extracción permitió la detección y cuantificación de 4 compuestos citostáticos: metotrexato, ciclofosfamida, docetaxel y paclitaxel.

### 5.2.1.2. Extracción MCX

Los cartuchos MCX utilizan un relleno de modo mixto que combina el mecanismo de fase reversa con un mecanismo de intercambio catiónico, resultando por tanto más selectivos para compuestos de naturaleza alcalina. La retención de estos compuestos por el mecanismo de intercambio catiónico se ve favorecida si se encuentran en su forma ionizada, por lo que fue necesario la acidificación de la muestra (1 mL) con 2 mL de ácido fórmico 10% en agua. En la etapa siguiente se realizó un primer lavado con 2 mL de ácido fórmico 10% para mantener la forma ionizada de los analitos, y un segundo lavado con 2 mL de metanol para eliminar aquellos compuestos no ionizados que no hubiesen quedado unidos al relleno de la columna por el mecanismo de intercambio catiónico, y los compuestos que se han unido por el mecanismo de fase reversa. Finalmente, en la etapa de elución fue necesario recuperar los compuestos de su forma ionizada, para lo que se utilizaron 3 mL de una mezcla de DCM:IPA:NH<sub>3</sub> (70:25:5, v/v/v) (pH 12).

Esta extracción permitió la detección y cuantificación de 7 compuestos citostáticos: gemcitabina, dacarbazina, doxorubicinol, irinotecán, doxorubicina, epirubicina y vinorelbina.

En cuanto a las técnicas utilizadas para la extracción de fármacos citostáticos en muestras de orina, algunos autores también utilizan distintos métodos de extracción en función del compuesto a analizar, bien SPE o LLE [200; 212; 230; 231; 235; 418]. Se trata de metodologías para la

determinación de unos pocos compuestos, entre ellos ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato, paclitaxel y/o 5-fluorouracilo, en las que se utiliza principalmente, pero no exclusivamente, LLE para la extracción de agentes alquilantes y SPE para los demás compuestos, aunque también se ha descrito el uso de 2 SPE diferentes utilizando cartuchos de fase reversa (C18) y cartuchos de naturaleza hidrófila (HLB) [232]. Por su parte, Ziegler et al. (2002) [201] y Mason et al. (2005) [205] utilizaron LLE para determinar ciclofosfamida e ifosfamida, y técnicas de inmunoensayo para la detección de metotrexato, por lo que no se requirió la extracción inicial de la muestra. Por el contrario, otros autores utilizaron un único procedimiento de extracción, ya sea mediante LLE o SPE [213; 455]. En cuanto a las LLE, la mayoría de estas extracciones se utilizan para determinar uno o dos compuestos, principalmente ciclofosfamida sola [126; 190; 192; 193; 199; 215; 220; 224; 226; 456-458] o combinada con ifosfamida [94; 198; 202; 203; 210; 459] o alfa-fluoro-beta-alanina (FBAL) (metabolito de 5-fluorouracilo) [224], aunque también se ha descrito un método que incluye doxorubicina y epirubicina [178]. La misma situación se produce con la SPE, que ha sido utilizada para determinar ciclofosfamida sola [77; 133; 191; 216] o combinada con ifosfamida [213; 455] o metotrexato [197; 204]. Otras SPE se emplearon para detectar FBAL [402; 404], gemcitabina y metabolitos [460] o antraciclinas solas (entre ellas doxorubicina, epirubicina, daunorubicina e idarubicina) [214; 461] o combinadas con ciclofosfamida e ifosfamida [211]. Solo unos pocos métodos de SPE permiten la evaluación simultánea de múltiples compuestos perteneciente a familias químicas diferentes, entre ellos el desarrollado por Izzo et al. (2018) [233], o el método de Fabrizi et al. (2016) [229], que utiliza un cartucho personalizado con características HLB y C18. Por último, se ha descrito también del empleo de la técnica “*dilute and shot*”, que consiste en la dilución de la muestra e inyección en el equipo cromatográfico sin tratamiento adicional. Sin embargo, esta metodología ha sido aplicada para la determinación de ciclofosfamida y metabolitos en muestras de orina de pacientes a tratamiento, por lo que el nivel de sensibilidad requerido es mucho menor, situándose el LOD en 5 ng/mL [462], mientras que en términos de exposición ocupacional el valor se situaría alrededor de 10 pg/mL. Durante la optimización del método de extracción se aplicó la técnica “*dilute and shot*” aplicando un factor de dilución 1/20, con un volumen de inyección de 10 µL, situándose los niveles de detección entre 0,1 ng/mL y 10 ng/mL, en función del compuesto, cifra todavía muy elevada

para los bajos niveles de detección exigidos según los resultados encontrados en la literatura, motivo por el cual este procedimiento fue descartado.

El disolvente más común en el caso de las LLE ha sido el acetato de etilo [94; 178; 190; 192; 193; 198-201; 203; 210; 215; 220; 224; 226; 456; 459], aunque también se han descrito procedimientos empleando diclorometano [231], dietiléter [220; 224; 458], tert-butilmetiléter [126; 202; 212; 418] o mezclas de acetato de etilo:diclorometano [456], tanto en medio neutro como básico. La gran mayoría de estos procedimientos se aplicaron para la determinación de agentes alquilantes, aunque otros autores como Connor et al. (2010) [212] y Pretty et al. (2012) [418] también incluyeron paclitaxel; Yoshida et al. (2013) [224] incorporaron FBAL, y Sottani et al. (2010) [178] que también analizaron antraciclinas además de agentes alquilantes, en medio neutro o básico. Estos resultados también fueron obtenidos durante el desarrollo de este método analítico, en las cuales ciclofosfamida fue extraída con acetato de etilo y también con dietiléter tanto en medio ácido como básico. Por su parte, docetaxel y paclitaxel dieron resultados válidos con dietiléter en medio ácido. Por tanto, la metodología LLE es adecuada para la determinación de una o 2 familias de compuestos, pero no permitió la extracción de los diferentes grupos de fármacos incluidos en la presente metodología.

En cuanto a la SPE, se ha descrito el uso de cartuchos de fase reversa con base de sílice y ligando C18 [208; 211; 213; 232; 418; 425; 455; 461] para la determinación de compuestos alquilantes y antraciclinas. Sin embargo, cartuchos similares con el mismo mecanismo de interacción también han permitido la determinación de estos y otros compuestos de naturaleza más polar, tales como los cartuchos con adsorbentes de base polimérica como poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) para la determinación de agentes alquilantes, antraciclinas, taxanos, metotrexato e irinotecán [191; 206; 233]; cartuchos con adsorbente compuesto por DVB copolimerizado con N-vinilpirrolidona (PVP-DVB o HLB) (que incrementa la retención de los compuestos polares) para la detección de antraciclinas, gemcitabina y FBAL [214; 232; 402; 404; 460]; o combinaciones de adsorbentes C18 y PVB [204; 229]. El método desarrollado por Fabrizi et al. (2016) [229] mediante la combinación de ambos adsorbentes permitió la detección de hasta 13 compuestos diferentes en una única extracción, ya que proporciona una alta retención de compuestos polares y apolares, muy útil para la variedad de

compuestos a analizar. Sin embargo, estos cartuchos no están comercializados, lo que requiere una etapa adicional de optimización de la mezcla de adsorbentes y preparación de estos cartuchos personalizados, por lo que se descartó esta práctica en la metodología descrita en este capítulo. Otra metodología de extracción SPE se basó en cartuchos de intercambio aniónico para la determinación de metotrexato y FBAL tras acidificar la muestra [230; 231; 234; 235]. Cabe mencionar el uso de cartuchos de tierra de diatomeas, que más que una SPE en sí misma actúa como fase estacionaria en LLE [133]. Por lo general, en los métodos de fase reversa, usados la mayoría de ellos para la determinación de agentes alquilantes, se neutralizó o alcalinizó la muestra antes de la SPE. Por el contrario, en los métodos multianálito se utilizó un pH ácido [229; 233].

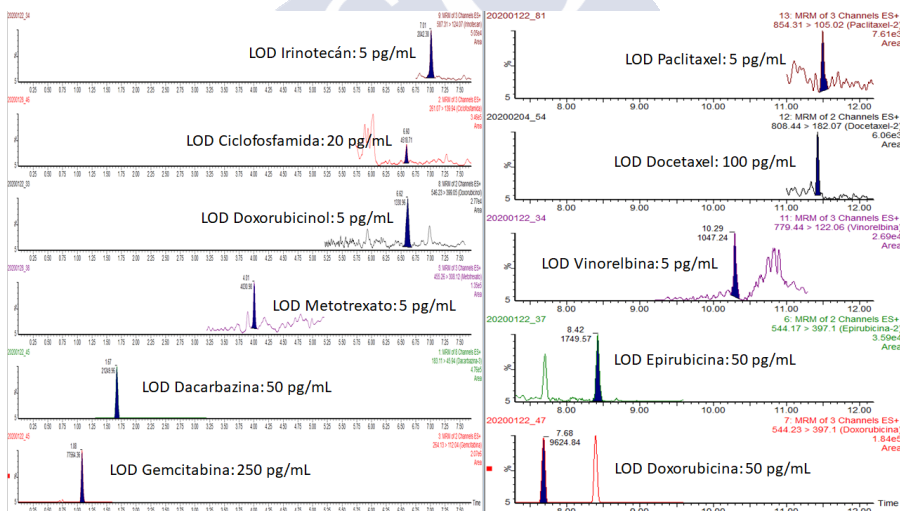
Finalmente, la mayor parte de los métodos utilizaron volúmenes de muestra entre 1-5 mL [133; 203; 206; 214; 231; 459], siendo 5 mL el más utilizado [126; 192; 193; 199; 211; 213; 215; 217; 220; 226; 231; 232; 286; 418; 455-458], aunque también se ha descrito un volumen de muestra de 500  $\mu$ L [233] e incluso de 100  $\mu$ L [462]. Sin embargo, en este último caso se trató de un método en orina de pacientes, por lo que se requiere una menor sensibilidad analítica.

En la metodología descrita en este capítulo se evaluaron volúmenes de muestra de 100, 200, 500 y 1000  $\mu$ L fortificadas a 2 concentraciones diferentes (50 pg/mL y 1000 pg/mL), siendo el volumen de 1000  $\mu$ L el que proporcionó una mejor relación entre el área obtenida y el ruido o efecto matriz observado.

### 5.2.2. Condiciones cromatográficas

Se realizó la conversión de gradiente, flujo y columna cromatográfica empleado en la metodología para la determinación de citostáticos en superficies y brazaletes descrito en el Capítulo IV desde el sistema HPLC al nuevo sistema UPLC® mediante un programa de conversión, siendo la columna recomendada la Atlantis® HSS T3 75 x 2,1 mm, 1,8  $\mu$ m, con un gradiente de 8,5 minutos (gradiente corto) y un flujo de 0,5 mL/min. Sin embargo, con el gradiente y columna recomendados por el programa informático no se consiguió una adecuada resolución de los isómeros doxorubicina y epirubicina. Por ello, se optó por probar la columna Cortecs® T3 (100 x 2,1 mm, 1,6  $\mu$ m) y el gradiente descrito en la metodología de

superficies (gradiente largo). El gradiente corto, para ambas columnas, dio lugar a una menor sensibilidad para todos los compuestos e interferencias en el blanco para gemcitabina y metotrexato (en las 2 transiciones monitorizadas), y para ciclofosfamida (en la transición cualificadora) en los calibradores bajos, por lo que se descartó de la metodología. Por su parte, en cuanto a las dos columnas evaluadas, la Cortecs® produjo una mayor señal para todos los compuestos, a excepción de gemcitabina y dacarbazina. Además, resolvió mejor las interferencias, produjo menor ruido a concentraciones bajas, mejoró un poco la separación entre los dos isómeros, y permitió obtener picos cromatográficos más estrechos y mejor definidos, por lo que fue la columna de elección. Finalmente, dado que el último compuesto eluye con un tiempo de retención de 11,5 minutos, el uso del sistema UPLC® permitió reducir el tiempo de acondicionamiento desde los 20,5 minutos del gradiente de superficies a un tiempo total de análisis de 15 minutos. La **Figura 7** muestra los cromatogramas de las transiciones cuantificadoras para cada analito en orina al LOD.



**Figura 7:** Cromatograma con las transiciones cuantificadoras para cada analito al LOD.

La mayoría de los métodos de cromatografía líquida en muestras de orina utilizaron columnas analíticas de fase reversa C8, C12 o C18 de dimensiones entre 50 y 250 mm [198-200; 204; 206; 208; 211; 213; 214; 226; 231; 233; 404; 455; 456; 459-462], mayoritariamente para la determinación de ciclofosfamida sola o combinada con ifosfamida, metotrexato, paclitaxel, gemcitabina, irinotecán, FBAL y antraciclinas. Otros autores utilizaron una columna con ligando pentafluorofenil (PFP) [230; 235], entre los que destaca Fabrizi et al. (2016) [229] por separar 13 compuestos citostáticos, o columnas con ligando hidrofóbico e hidrofílico [232]. Dugheri et al. (2018b) [232] y Ndaw et al. (2010) [402] utilizaron una columna con mecanismo de interacción hidrofílica (HILIC) para la determinación de FBAL, un metabolito polar de 5-fluorouracilo. Las fases móviles más utilizadas fueron metanol [198-200; 204; 206; 210; 234; 404] y ACN [211; 214; 229; 231-233; 459; 460], o una mezcla de ambas [213; 455; 461], junto con disoluciones modificadoras de carácter ácido (formiato amónico, acetato amónico, ácido fórmico o ácido acético), tanto en mezclas binarias como ternarias. Dugheri et al. (2018b) [232] trabajaron en modo isocrático para determinar FBAL. Por su parte, Turci et al. (2002) [200] también aplicaron esta metodología para el análisis de agentes alquilantes y metotrexato, utilizando distintas columnas y fases móviles en función del compuesto; y Mader et al. (1996) [196] enlazaron el modo de trabajo isocrático utilizando una columna de intercambio aniónico con el modo gradiente en una columna de fase reversa para la determinación de metotrexato. Además de la cromatografía líquida, numerosos autores han empleado la cromatografía de gases para la detección de citostáticos en orina, principalmente ciclofosfamida y FBAL [94; 126; 133; 192-194; 197; 201; 202; 205; 207; 215; 217; 218; 220; 225; 234; 247; 286; 292; 457; 458], lo que requiere una etapa adicional de derivatización.

Solo unos pocos trabajos realizaron la monitorización de múltiples fármacos citostáticos en orina. Así, Fabrizi et al. (2016) [229] evaluaron 13 compuestos; Izzo et al. (2018) [233] evaluaron 8 compuestos; Pethran et al. (2003) [202] analizaron 7 compuestos; y Turci et al. (2010) [219] determinaron 6 compuestos, mientras que la mayoría de ellos monitorizan únicamente unos pocos fármacos. Aún así, muchos de los compuestos pertenecen a la misma familia, caso de ciclofosfamida e ifosfamida, o doxorubicina, epirubicina, daunorubicina e idarubicina, o los compuestos de platino como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino [178; 202; 211].

Ciclofosfamida ha sido el compuesto mayoritariamente monitorizado en la orina de los trabajadores sanitarios, aunque en muchos de los trabajos fue evaluado de forma individual (19 trabajos) o en combinación con ifosfamida (8 trabajos) [94; 194; 198; 203; 209; 210; 213; 455] y metotrexato (7 trabajos) [200; 201; 205; 206; 230; 231; 247]. Otros fármacos monitorizados han sido gemcitabina, dacarbazina, etopósido, irinotecán, paclitaxel, 5-fluorouracilo y/o su metabolito (alfa-fluoro-beta-alanina o FBAL) y compuestos de platino como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

En cuanto al tiempo de análisis cabe destacar que, a excepción de 2 trabajos publicados por Fabrizi et al. (2016) [229] e Izzo et al. (2018) [233], que utilizan una metodología basada en técnicas de UHPLC, el resto de trabajos emplean sistemas HPLC, por lo que el tiempo de análisis se incrementa considerablemente, dando lugar a métodos largos considerando el bajo número de analitos que monitorizan (entre 1 y 5 compuestos con tiempos de análisis entre 11 y más de 27 minutos) [206; 208; 210; 211; 213; 214; 231; 232; 455; 459-462].

Por tanto, la metodología desarrollada en este documento se presenta como un método multicomponente que incluye distintas familias de fármacos y permite el análisis simultáneo de muchos de los citostáticos más frecuentemente empleados en la práctica clínica en un tiempo total de 15 minutos.

### 5.2.3. Condiciones de espectrometría de masas

La infusión de disoluciones de los compuestos a 100 ng/mL permitió obtener las transiciones mayoritarias para cada uno de ellos, así como los voltajes de cono y energías de colisión óptimas para obtener dichos fragmentos. El voltaje capilar que produjo una mejor señal analítica en conjunto para todos los compuestos fue de 1 kV. Se trabajó en modo MRM. La **Tabla 23** recoge el método de masas empleado en la detección de los compuestos incluidos en la metodología y sus correspondientes PI.

Se evaluaron distintas fuentes de ionización [ElectroSpray (ES) y UniSpray® (US)]. La fuente US es un nuevo sistema de ionización patentado por Waters Corporation que proporciona una ionización más completa, mejorando la eficacia del proceso para proporcionar un potencial aumento de la sensibilidad, y permitiendo la ionización de un intervalo más amplio de analitos. Su geometría única, basada en el efecto Coanda, genera diferentes

mecanismos para producir gotas más pequeñas y mejorar la desolvatación. Estos efectos se combinan para producir un mayor número de iones libres a partir de la misma cantidad de muestra.

La fuente US proporcionó una mayor sensibilidad para todos los compuestos, a excepción de irinotecán, ciclofosfamida y vinorelbina. Sin embargo, el aumento de la señal no varió considerablemente al incrementar el volumen de inyección, a diferencia de lo que ocurre con la fuente ES. Además, no está recomendada la inyección de grandes volúmenes al emplear la fuente US ya que, debido a sus características, puede entrar mayor cantidad de coeluyentes de la muestra en la región de alto vacío, incrementado el ruido. Por ello, se descartó el uso de la fuente US y, en su lugar, se utilizó la fuente ES, empleando un volumen de inyección de 10 µL.

**Tabla 23:** Método de MRM utilizado para la detección de 12 compuestos citostáticos en orina.

Compuesto	Transición	T <sub>R</sub> (min)	VC	EC	PI
Gemcitabina	<u>264,13&gt;112,04</u> 264,13>94,88	1,07	40 40	14 38	Dacarbazina-d6
Dacarbazina	<u>183,11&gt;45,94</u> 183,11>64,9	1,68	30 30	6 26	Dacarbazina-d6
Dacarbazina-d6	189,2>52,09	1,67	20	6	-
Metotrexato	<u>455,26&gt;308,12</u> 455,26>134,02	4,01	50 50	22 38	Metotrexato-d3
Metotrexato-d3	458,2>311,11	4,00	50	20	-
Doxorubicinol	<u>546,23&gt;399,05</u> 546,23>363,11	6,64	30 30	12 24	Irinotecán-d10
Irinotecán	<u>587,31&gt;124,07</u> 587,31>167,12	7,09	80 80	34 36	Irinotecán-d10
Irinotecán-d10	597,37>133,05	7,07	80	32	-
Ciclofosfamida	<u>261,07&gt;139,94</u> 261,07>106,0	6,61	20 20	22 18	Ciclofosfamida-d4
Ciclofosfamida-d4	265,07>139,94	6.58	20	22	-
Doxorubicina	<u>542,23&gt;397,1</u> 542,23>378,89	7,77	30 30	12 20	Irinotecán-d10
Epirubicina	<u>544,17&gt;397,1</u> 544,17>130,06	8,48	40 40	14 14	Irinotecán-d10

Compuesto	Transición	T <sub>R</sub> (min)	VC	EC	PI
Vinorelbina	<u>779,44&gt;122,06</u>	10,33	60	48	Vinorelbina-d3
	<u>779,44&gt;658,36</u>		60	24	
Vinorelbina-d3	<u>782,38&gt;122,06</u>	10,31	62	32	-
Docetaxel	<u>808,44&gt;182,07</u>	11,44	10	20	Paclitaxel-d5
	<u>805,44&gt;226,02</u>		10	20	
Paclitaxel	<u>854,31&gt;105,02</u>	11,49	30	32	Paclitaxel-d5
	<u>854,31&gt;121,99</u>		30	30	
Paclitaxel-d5	<u>859,38&gt;291,09</u>	11,49	40	16	-

Las transiciones subrayadas son las empleadas como cuantificadoras. VC: voltaje de cono (V); EC: energía de colisión (eV); t<sub>R</sub>: tiempo de retención (min); PI: patrón interno.

Los equipos de detección utilizados en los distintos trabajos encontrados fueron mayoritariamente espectrómetros de masas, tanto simples [94; 126; 133; 192; 193; 201; 202; 205; 210; 217; 220; 225; 247; 458] como en tándem [77; 178; 198-200; 203; 204; 206; 207; 209-213; 215; 216; 218; 219; 222; 226; 229-235; 286; 404; 418; 455-457; 459; 461; 462], acoplados a sistemas de cromatografía líquida o gaseosa. También se han utilizado, aunque en menor medida, detectores de captura electrónica [194; 197], detectores ultravioleta para la detección de 5-fluorouracilo [219; 286] y detectores de fluorescencia para la detección de antraciclinas [208; 214].

En cuanto al tipo de analizador de los espectrómetros de masas, el más utilizado ha sido el cuadrupolo, bien simple o en tándem, aunque también se ha descrito el uso de trampa de iones [207; 213] e incluso la combinación de ambos, lo que se conoce como analizadores híbridos [229; 418]. Por su parte, Yoshida et al. (2013) [224] han utilizado espectrómetros de masas de alta resolución para la determinación de ciclofosfamida y FBAL.

Por otro lado, se ha descrito el empleo de otras técnicas de detección no relacionadas con la espectrometría de masas. Así, autores como Ziegler et al. (2002) [201] y Mason et al. (2005) [205] han utilizado técnicas de detección basadas en inmunoensayos para detectar y cuantificar metotrexato en orina de trabajadores hospitalarios, y Sessink et al. (1994b) [195] desarrollaron un inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA) para determinar metotrexato en orina de trabajadores de una industria farmacéutica.

#### **5.2.4. Validación del método en orina**

Al igual que en el método de superficies y brazaletes, la validación del método en orina se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas en la guía de la SWGTOX [405].

##### **5.2.4.1. Selectividad/Especificidad**

La matriz de análisis en el método de superficies es el tejido VWR, de idéntica composición en todos los casos; sin embargo, en esta metodología, la composición de la orina puede variar de un individuo a otro, por lo que pueden estar presentes otros componentes en la matriz que afecten a la señal de los analitos. Por ello, para demostrar la ausencia de interferencias en la matriz de orina, se analizaron 10 muestras blanco procedentes de distintas fuentes (en el método de superficies se analizaron 4 muestras de tejido VWR, todas de la misma fuente), a las que se les añadió la mezcla de PI, para descartar la presencia de interferencias endógenas. En ningún caso se detectó señal analítica apreciable al tiempo de retención de los analitos de interés.

El efecto en la señal analítica del patrón debido a su homólogo deuterado también fue descartado tras el análisis de muestras blanco fortificadas con los PI preparadas cada vez que se realizó una recta de calibrado.

Por último, debido a que en el laboratorio de Toxicología se manejan y analizan diferentes fármacos y drogas de abuso, así como la posible exposición a medicamentos inmunosupresores por parte de los profesionales sanitarios durante la jornada laboral y/o el posible consumo de algún fármaco u otro tipo de sustancias, se evaluaron una serie de disoluciones conteniendo gran variedad de fármacos, drogas de abuso y otros analitos para descartar la presencia de interferencias exógenas. Las sustancias incluidas para estudiar posibles interferencias exógenas fueron las mismas que en la metodología de superficies y, además, debido a la posibilidad de que los participantes reciban tratamiento con algún fármaco, se incluyeron otras sustancias como quetiapina, haloperidol, levomepromazina, clozapina, olanzapina, fentanilo, olanzapina, enalaprilol, loratadina, oxicodona, noroxicodona, levomepromazina, tramadol, propoxifeno, atenolol, propranolol, ebastina, sildenafilo, quetiapina, oxcarbamazepina, carbamazepina, MHD, tolbutamida, topiramato,

paracetamol, metformina y ácido acetilsalicílico. Ninguna de estas sustancias produjo interferencias en la señal analítica correspondiente al tiempo de retención de los compuestos citostáticos incluidos en la presente metodología.

#### 5.2.4.2. Modelo de calibración

El modelo de calibración se estableció a partir de 6-8 niveles de concentración distintos, que varían en función del compuesto, y una muestra blanco fortificada con los PI. Los niveles se establecieron en 10, 20, 50, 100, 200, 500, 750 y 1000 pg/mL para los compuestos del grupo A, y en 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 3750 y 5000 pg/mL para los compuestos del grupo B.

El rango de linealidad fue de 10-1000 pg/mL para metotrexato, doxorubicinol, irinotecán, vinorelbina y paclitaxel, mientras que para ciclofosfamida y dacarbazina el calibrador más bajo se estableció en 20 pg/mL y 50 pg/mL, respectivamente. La linealidad se estableció entre 250-5000 pg/mL para gemcitabina, y entre 100-5000 pg/mL para docetaxel. Para doxorubicina y epirubicina no fue posible realizar una determinación cuantitativa, por lo que estos compuestos fueron validados cualitativamente.

El modelo matemático que mejor describió la correlación entre la concentración del analito y la señal instrumental producida por el detector fue el modelo lineal con ponderación 1/x para todos los compuestos.

En todos los casos se cumplieron satisfactoriamente los criterios exigidos en la guía de la SWGTOX con respecto al coeficiente de correlación ( $r^2 > 0,99$ ) y las residuales ( $\pm 20\%$ ). En la **Tabla 24** se recogen los valores medios para los parámetros de validación obtenidos en las 5 rectas de calibrado analizadas para evaluar el modelo matemático de calibración.

**Tabla 24:** Valores medios  $\pm$  desviación estándar de los parámetros relativos al modelo de calibración para los compuestos citostáticos en orina.

Compuesto	y=a+b*x		
	Intercept (a)	Pendiente (b)	r <sup>2</sup>
Gemcitabina	-25,8680 $\pm$ 399,85	9,4977 $\pm$ 3,1675	0,9979 $\pm$ 0,0011
Dacarbazina	25,2278 $\pm$ 21,3280	6,5806 $\pm$ 0,6718	0,9991 $\pm$ 0,0011
Metotrexato	21,0720 $\pm$ 7,6390	9,4568 $\pm$ 0,666	0,9969 $\pm$ 0,0019
Doxorubicinol	21,7841 $\pm$ 10,2753	7,2979 $\pm$ 1,9724	0,9975 $\pm$ 0,0021
Irinotecán	18,4148 $\pm$ 14,9937	14,5330 $\pm$ 1,3917	0,9986 $\pm$ 0,0015

Compuesto	y=a+b*x		
	Intercept (a)	Pendiente (b)	r <sup>2</sup>
Ciclofosfamida	28,4581 ± 39,8419	5,2448 ± 1,0941	0,9992 ± 0,0010
Vinorelbina	21,3795 ± 11,0642	8,2328 ± 1,5875	0,9992 ± 0,0006
Docetaxel	1,2714 ± 1,2685	0,0057 ± 0,1805	0,9971 ± 0,0015
Paclitaxel	1,7633 ± 1,4064	1,4206 ± 0,0700	0,9985 ± 0,0009

### 5.2.4.3. Límite de detección

El LOD se determinó como la concentración más baja para la que se pueden detectar las dos transiciones para cada compuesto al tiempo de retención obtenido de media en los calibradores ±0,2 minutos, con una relación S/N >3, y con ión ratio igual al valor medio de los calibradores ± desviación permitida (de acuerdo con los límites de tolerancia establecidos en la Directiva del Consejo Europeo 96/23/EC [411]).

Los valores de LOD obtenidos oscilaron entre 5 y 250 pg/mL. La **Tabla 25** recoge los resultados obtenidos para cada compuesto.

### 5.2.4.4. Límite de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en función de la menor concentración de analito que pudo ser cuantificada con adecuada exactitud y precisión, es decir, con valores de %CV <20% y MRE ±20% (**Tabla 25**). En todos los casos, el %CV y el MRE se encontraron dentro del límite establecido, situándose incluso en ±12% para %CV y ±10 para MRE.

Los valores de LOQ obtenidos oscilaron entre 10 y 250 pg/mL. Estos valores coinciden con el LOD para gemcitabina, dacarbazina, doxorubicinol, ciclofosfamida, vinorelbina y docetaxel.

**Tabla 25:** Límites de detección y cuantificación de los 12 compuestos citostáticos en orina.

Compuesto	LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	LOQ (pg/cm <sup>2</sup> )
Gemcitabina	250	250
Dacarbazina	50	50
Metotrexato	5	10
Irinotecán	5	10
Doxorubicinol	10	10
Doxorubicina**	50	-

Epirubicina**	10	-
Ciclofosfamida	20	20
Vinorelbina	10	10
Docetaxel	100	100
Paclitaxel	5	10

\*\*Compuestos validados cualitativamente

#### 5.2.4.5. Exactitud y Precisión

En todos los casos se cumplieron los criterios exigidos en cuanto al %CV  $\leq 20\%$  y MRE  $\pm 20\%$ . La **Tabla 26** recoge los valores obtenidos para cada compuesto.



**Tabla 26:** Resultados de exactitud total y precisión interdía, intradía y total para los 9 compuestos citostáticos validados cuantitativamente.

Compuesto	Concentración (pg/mL)	Exactitud Total (n=15)	Precisión Interdía (n=5)	Precisión Intradía (n=15)	Precisión Total (n=5)
		MRE (%)	%CV	%CV	%CV
Gemcitabina	750	0,7	7,7	9,0	11,8
	1250	-2,6	9,1	8,4	12,4
	3750	-3,8	10,7	3,4	11,2
Dacarbazina	150	2,4	2,7	2,7	3,9
	250	4,0	1,3	4,4	4,5
	750	4,4	4,6	2,2	5,1
Metotrexato	30	-3,8	6,4	5,2	8,3
	250	-4,1	0,0	5,5	5,5
	750	-3,4	6,3	7,3	9,6
Doxorubicinol	30	-1,9	5,6	4,0	6,9
	250	-0,3	6,1	2,5	6,6
	750	2,2	5,7	4,9	7,5
Irinotecán	30	-2,5	1,1	3,5	3,7
	250	2,0	4,0	2,2	4,6
	750	1,3	5,3	3,3	6,2
Ciclofosfamida	30	-3,7	4,7	3,6	5,9
	250	-0,5	3,2	2,9	4,3
	750	-2,1	3,4	4,8	5,8
Vinorelbina	30	0,3	3,4	3,7	5,0
	250	2,5	2,3	2,9	3,7
	750	0,3	8,1	1,9	8,3
Docetaxel	150	-0,7	2,6	9,1	9,5
	250	14,9	1,5	2,5	2,9
	750	11,1	1,8	5,6	5,8
Paclitaxel	30	-0,2	4,4	5,6	7,1
	250	0,3	0,9	2,5	2,6
	750	-3,6	2,2	2,2	4,1

#### 5.2.4.6. Efecto matriz

No se observó efecto matriz para metotrexato y docetaxel, ni tampoco para el análogo deuterado metotrexato-d3 (valores  $\pm 20\%$ ). Doxorubicinol no sufrió efecto matriz a QC bajo pero experimentó un leve efecto supresor a QC alto.

Los resultados obtenidos para el resto de compuestos muestran un efecto de supresión o potenciación de la señal analítica dependiente de compuesto. Estos valores se resumen en la **Tabla 27**.

Los compuestos para los cuales se produjo un efecto de supresión de la señal fueron gemcitabina, dacarbazina, irinotecán, ciclofosfamida, doxorubicina y paclitaxel. En el caso de gemcitabina, este efecto fue menor que el del PI dacarbazina-d6 aunque, dado que el %CV de las muestras fortificadas tras la extracción fue  $< 20\%$ , se considera que este efecto es constante y, además, cumplió los criterios de aceptación en cuanto a precisión y exactitud. En el caso de irinotecán, ciclofosfamida y paclitaxel el efecto supresor se ve compensado en similar magnitud por sus correspondientes PI. En cuanto a doxorubicina, el efecto supresor se produce en magnitud similar al PI irinotecán-d10, lo que permite una adecuada detección al LOD.

Los compuestos para los cuales se produjo un efecto potenciador de la señal fueron epirubicina y vinorelbina. En el caso de epirubicina, esto permitió obtener un menor LOD en comparación con su isómero doxorubicina. En cuanto a vinorelbina, la baja señal analítica que produce en muestras "neat" tanto a QC bajo como alto, explicaría el gran efecto matriz obtenido.

El %CV de los 10 replicados de muestras fortificadas tras la extracción fue  $> 20\%$  para metotrexato, irinotecán, ciclofosfamida, vinorelbina y paclitaxel, y en magnitud similar para sus correspondientes PI, por lo que se compensaría la variabilidad obtenida. Doxorubicinol y doxorubicina presentan un %CV similar al PI irinotecán-d10, y docetaxel presenta un %CV similar al PI paclitaxel-d5. Por su parte, se obtuvo un %CV  $< 20\%$  para epirubicina.

### 5.2.4.7. Rendimiento de extracción y eficiencia del proceso

El rendimiento de extracción osciló entre 47,1% y 130,4%. Los valores superiores al 100% ( $\pm 20\%$ ) corresponden a paclitaxel, el cual presentó un %CV  $> 20\%$  en las muestras fortificadas tras la extracción en comparación con las muestras fortificadas antes de la extracción ( $< 7\%$ ), dado que en este último caso la matriz procede de la misma fuente para todos los replicados, mientras que cada una de las muestras fortificadas post-extracción proceden de fuentes distintas. Por su parte, la eficiencia del proceso se situó entre 28,5% y 107,4%. El valor de eficiencia del proceso para vinorelbina fue de 1438,8% a QC alto debido a, según lo explicado en el apartado anterior, el elevado efecto matriz que experimenta este compuesto. Los valores de %CV de las muestras fortificadas antes de la extracción fueron  $< 20\%$  para todos los compuestos. La **Tabla 27** recoge los valores obtenidos para estos parámetros en todos los compuestos.

**Tabla 27:** Resultados de efecto matriz, rendimiento de extracción y eficiencia del proceso (%) para todos los compuestos en orina.

Compuesto	Efecto matriz		Rendimiento extracción		Eficiencia del proceso	
	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto
Gemcitabina	-33,0	-31,8	62,8	71,8	41,8	49,0
Dacarbazina	-66,7	-65,4	94,4	82,4	31,5	28,5
Metotrexato	14,6	15,9	71,7	72,2	82,1	83,7
Doxorubicinol	-9,1	-21,5	59,3	66,8	53,9	52,5
Irinotecán	-32,6	-33,2	68,3	80,7	46,1	55,3
Ciclofosfamida	-54,5	-64,4	96,6	88,4	43,9	31,5
Doxorubicina	-29,4	-16,8	77,9	47,1	55,0	39,1
Epirubicina	24,4	24,6	49,2	53,3	61,2	66,5
Vinorelbina	394,2	1636,0	79,9	82,9	394,9	1438,8
Docetaxel	-8,4	-2,4	104,7	109,9	96,0	107,4
Paclitaxel	-15,6	-25,5	121,0	130,4	102,2	97,1

Dacarbazina-d6	-68,4	-69,2	91,3	86,3	28,9	26,6
Metotrexato-d3	11,7	11,8	72,6	71,5	81,1	79,9
Irinotecan-d10	-43,2	-38,2	76,5	88,9	43,5	54,9
Ciclofosfamida-d4	-69,1	-69,1	78,6	84,8	24,3	26,2
Vinorelbina-d3	296,7	1401,2	100,3	99,5	397,8	1493,6
Paclitaxel-d5	-23,3	-26,6	116,5	127,6	89,4	93,7

#### 5.2.4.8. Estabilidad

El porcentaje de pérdida o ganancia con respecto al valor obtenido en muestras QC preparadas frescas y analizadas simultáneamente se encontró dentro del límite establecido (%pérdida/ganancia  $\pm 20\%$ ) en todos los casos. Los distintos valores de estabilidad para cada compuesto se resumen en la **Tabla 28**.

El porcentaje de pérdida o ganancia para todos los analitos cuando las muestras se reinyectaron tras su almacenamiento durante 72 horas a 6°C en el "autosampler" osciló entre -12,7% y 9,5%.

En cuanto a la estabilidad a largo plazo, los valores calculados tras la conservación de las muestras durante 2 meses a -22°C estuvieron comprendidos entre -11,8% y 12,7%.

Finalmente, los valores de estabilidad calculados tras 3 ciclos de congelación/descongelación oscilaron entre -19,8% y 16,0%.

**Tabla 28:** Resultados de estabilidad para cada compuesto en orina en comparación con muestras frescas (%).

Compuesto	Estabilidad "autosampler"		Estabilidad - 22°C		Estabilidad "F/T"	
	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto	QC bajo	QC alto
Gemcitabina	9,5	8,9	4,0	12,7	11,7	2,8
Dacarbazina	-1,9	1,3	-8,6	-10,2	-19,8	-19,0
Metotrexato	2,7	2,4	-2,0	6,4	-5,8	-6,0
Doxorubicinol	-4,1	1,6	4,4	0,5	-11,3	-13,1
Irinotecán	-4,0	-2,8	1,5	7,2	-1,7	-12,5
Ciclofosfamida	3,1	-0,8	-9,1	-3,7	16,0	7,7
Doxorubicina	4,9	6,9	-11,8	0,3	10,7	-14,8
Epirubicina	-0,3	1,8	-6,9	-2,0	-1,7	-7,5
Vinorelbina	-11,3	-2,0	-3,1	12,2	6,0	-0,2
Docetaxel	-1,9	-12,7	7,4	8,8	-9,6	2,1
Paclitaxel	2,1	0,2	-0,9	-8,7	-13,3	-6,4

"F/T" = freeze/thaw.

Los resultados obtenidos para cada parámetro de validación se resumen en la **Tabla 29**.

**Tabla 29:** *Parámetros de validación evaluados y resultados obtenidos para cada uno de ellos en la metodología de orina.*

Parámetro	Resultados
Selectividad	Sin interferencias
Especificidad	Sin interferencias
Linealidad	Linealidad desde LLOQ hasta 1000/5000 pg/mL Regresión lineal aplicando ponderación 1/x Residual $\pm 20\%$ $r^2 \geq 0,9943$
Límite de detección	LOD entre 5-250 pg/mL
Límite de cuantificación	LLOQ entre 10-250 pg/mL
Exactitud	Exactitud: -4,1% a 14,9%
Precisión	*Intra-día: 1,9% a 9,1% *Inter-día: 0,9% a 10,7% *Total: 2,6% a 12,4%
Efecto matriz	Efecto matriz: -92,2% a 1300,4%
Rendimiento de extracción	Recuperación: 32,5% a 141,9%
Eficiencia del proceso	Eficiencia del proceso: 2,9% a 378,7%
Estabilidad "autosampler"	% pérdida/ganancia: -12,7% a 11,1%
Estabilidad a largo plazo	% pérdida/ganancia: -11,8% a 12,7%
Estabilidad tras 3 ciclos F/T	% pérdida/ganancia= -19,9% a 16,0%

A pesar de los numerosos métodos analíticos desarrollados hasta el momento en orina, son pocos los que realizan una descripción precisa de la metodología utilizada para llevar a cabo la validación del método [199; 206; 211; 214; 229; 231; 233; 404; 455; 460-462]. Estos métodos siguen las directrices de distintas guías de validación como EURACHEM [229], FDA [206; 211; 214; 460; 462], ICH [462] o EMA [233; 404], existiendo diferencias en cuanto a las recomendaciones, parámetros a evaluar, experimentos a realizar y criterios establecidos en cada una de ellas. Por lo general, a diferencia de las metodologías de superficies descritas en el capítulo anterior, la validación de los métodos en orina se realizó de manera más completa abarcando, además de parámetros como linealidad, exactitud y precisión, y LOD y LOQ, otros como selectividad, especificidad, recuperación, estabilidad, efecto matriz y *carry-over*.

En cuanto a los resultados de validación observados en estos estudios, cabe mencionar el LOD y el LOQ. Estos parámetros toman una gran amplitud de valores en función del trabajo, ya que dependen en gran medida del equipo instrumental utilizado, y del compuesto de que se trate. Así, podemos encontrar límites de detección para ciclofosfamida entre 2,5 y 200 pg/mL, siendo los valores más frecuentes entre 10 y 100 pg/mL. Los valores más bajos (2,5 y 9 pg/mL) se encontraron en metodologías desarrolladas con equipos UHPLC-MS/MS [230; 233; 235], aunque Yoshida et al. (2013) [224] han descrito un método para la determinación de ciclofosfamida basado en GC-HRMS con un LOD de 3 pg/mL. Por el contrario, también se han publicado métodos con valores de LOD para ciclofosfamida entre 1000 y 8100 pg/mL [192; 197; 232; 418], uno de los cuales, con un LOD de 5000 pg/mL, se aplicó para la determinación de ciclofosfamida en orina de pacientes, lo que explicaría el mayor valor utilizado [462]. Los LOD descritos para otros compuestos como metotrexato, gemcitabina, doxorubicina y epirubicina también presentan una gran variabilidad, con valores entre 5-200 pg/mL, 50-670 pg/mL, 4,5-2000 pg/mL y 6,1-1200 pg/mL, respectivamente. Izzo et al. (2018) [233] fueron los únicos que han incluido irinotecán en la metodología, con un LOD y LOQ de 2,5 pg/mL y 5 pg/mL, respectivamente. Del mismo modo, solo Fabrizi et al. (2016) [229] han incluido etopósido entre los compuestos a analizar, con un LOD y LOQ de 170 pg/mL y 500 pg/mL, respectivamente. Ninguno de los trabajos revisados incluyó vinorelbina en su metodología; sin embargo, otros compuestos de la familia de los alcaloides de la vinca como vincristina o vinblastina han sido monitorizados en su lugar, con un LOD de 170 pg/mL y 830 pg/mL, respectivamente [229].

En cuanto al LOQ, los valores oscilaron entre 5-200 pg/mL para ciclofosfamida, aunque se ha descrito un LOQ de 23,5 ng/mL [232]; 15-500 pg/mL para metotrexato; 9,9-1100 pg/mL para doxorubicina y 11-2000 pg/mL para epirubicina. Otros compuestos menos frecuentes como gemcitabina, dacarbazina y paclitaxel presentaron valores de LOQ entre 200 y 2000 pg/mL.

Por tanto, la metodología descrita en este capítulo proporciona una determinación multianalítica para 11 fármacos citostáticos pertenecientes a 8 familias químicas diferentes con unos LOD entre 5-250 pg/mL en función del compuesto, lo que permite la determinación simultánea de todos los analitos con una sensibilidad similar o inferior a la descrita en metodologías

previamente publicadas, a excepción del método publicado por Izzo et al. (2018) [233], cuyos LOD se sitúan en 2,5 pg/mL para ciclofosfamida e irinotecán, y en 5 pg/mL para metotrexato, ifosfamida, daunorubicina y bendamustina. Los métodos en los que se ha alcanzado un menor LOD/LOQ se caracterizan por la monitorización de pocos compuestos o por el uso de distintos equipos cromatográficos (LC o GC) en función del compuesto [424].

### 5.2.5. Aplicación a casos reales

Se incluyeron en el estudio 30 participantes, entre los que se encuentran farmacéuticos, técnicos de farmacia, enfermeros, auxiliares de enfermería, personal administrativo y personal de limpieza del Servicio de Oncología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Uno de los participantes no fue monitorizado debido a su ausencia durante los 3 días de recogida de muestras, un participante fue monitorizado solo el primer día, y dos participantes fueron monitorizados durante 2 días. Una muestra se perdió durante el proceso debido a razones logísticas. Finalmente, se obtuvo un total de 165 muestras pertenecientes a 29 trabajadores.

El grupo participante estuvo integrado por 4 farmacéuticos, 1 técnico de farmacia, 16 enfermeros, 3 auxiliares de enfermería, 1 celador, 3 personal administrativo y 1 personal de limpieza. Todos los farmacéuticos y el técnico de farmacia estuvieron implicados en la manipulación de fármacos citostáticos orales en la consulta de farmacia, mientras que entre los enfermeros, 7 de ellos participaron en la elaboración de preparaciones quimioterápicas y 9 fueron los responsables de administrar las preparaciones intravenosas a los pacientes. Los auxiliares de enfermería recibían y disponían las formulaciones para su administración, y el celador se encargaba del traslado de los pacientes. Por su parte, el personal de limpieza es el responsable de la limpieza y desinfección de los sillones de administración, las bombas de infusión y los baños de los pacientes, mientras que el personal administrativo, situado en el mostrador de recepción del Hospital de Día de Oncología, no mantuvo un contacto directo con los fármacos citostáticos, pero sí se encuentra en las proximidades de una zona en la que se manipulan estas sustancias.

Los hombres representaron el 10,3% (n=3) de los participantes. En cuanto a los trabajadores implicados en el manejo de fármacos citostáticos (farmacéuticos, técnicos, enfermeros, auxiliares, celadores y personal de

limpieza), la media de edad fue de 39,3 ±9,4 años (mediana: 40 años, rango: 28-63 años). La experiencia profesional total media fue de 13,7 ±8,3 años (mediana: 13,5 años, rango: 0,13-34 años) y la experiencia en el puesto actual fue de 5,9 ±6 años (mediana: 3,5 años, rango: 1 mes-17 años). Todas las preparaciones intravenosas se realizaron en CSB clase II. La información relativa al uso de los EPIs fue escasa, ya que solo se dispone de datos para el 24,1% (n=7) de los participantes. Los trabajadores implicados en tareas de preparación que respondieron a la encuesta (n=4) utilizaron guantes de nitrilo resistentes a antineoplásicos, máscaras autofiltrantes tipo FFP3, bata impermeable con puños elásticos y gorro desechable. Por su parte, el uso de calzas fue menor (25%).

En relación a la carga de trabajo, el número total de preparaciones de los compuestos citostáticos monitorizados fue de 196 durante toda la semana que duró la tercera campaña de monitorización, oscilando entre 1 (dacarbazina) y 52 (paclitaxel) preparados en función del compuesto. Los participantes implicados en la elaboración de formulaciones realizaron entre 9 y 62 preparaciones de los compuestos monitorizados. El total de formulaciones de compuestos citostáticos elaboradas fue de 381 (14-127 según el participante), entre los que se incluyen, además de los compuestos evaluados, otros fármacos antineoplásicos tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, idarubicina, citarabina, azacitidina, bortezomib, pemetrexed, ifosfamida, bleomicina, vincristina, vinblastina, mitomicina C, ciclosporina, micofenolato mofetilo, tiotepa y melfalán. Otros compuestos no citostáticos elaborados habitualmente han sido los anticuerpos monoclonales, aunque su frecuencia no ha sido registrada. La memoria anual del Servicio de Farmacia del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela sitúa la actividad relacionada con la elaboración de quimioterapia intravenosa en 24549 preparaciones realizadas en el año 2018, cifra muy similar a la obtenida en el 2017 y con una tendencia creciente desde el año 2011 [463; 464]. La cantidad total preparada de cada compuesto durante la semana de monitorización correspondiente a la campaña número 3 osciló entre 269 mg (vinorelbina) y 33250 mg (gemcitabina) (**Tabla 30**). El manejo de cantidades tan elevadas como en el caso de gemcitabina se debe a las altas dosis de tratamiento con este fármaco (dosis recomendada de 1000 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal, lo que equivale a alrededor de 1-2,5 mg por preparación).

**Tabla 30:** Cantidades preparadas de cada uno de los compuestos citostáticos objeto de estudio.

Compuesto	Total semanal (mg)	Media diaria $\pm$ SD (mg)	Mínimo (mg)	Máximo (mg)	Mediana (mg)
Gemcitabina	33250	6650 $\pm$ 1019,4	5420	7813,5	6314,5
Dacarbazina	672	672 $\pm$ 0	672	672	672
Metotrexato	142,3	47,4 $\pm$ 12,6	34,3	59,5	48,5
Irinotecán	8101,7	1620,3 $\pm$ 1005,4	487,2	2907,6	1245,7
Ciclofosfamida	21451,1	4290,2 $\pm$ 2430,4	1145	7799	3903,6
Doxorubicina	1166,3	233,3 $\pm$ 77,18	136,6	352,3	224,6
Epirubicina	1480,5	370,1 $\pm$ 171,3	119,4	490,5	435,3
Vinorelbina	269	67,3 $\pm$ 33,2	25,9	94,8	74,2
Docetaxel	1125,1	281,3 $\pm$ 35,2	255,2	333	268,4
Paclitaxel	9792,9	1958,6 $\pm$ 822,6	1035,9	3269,7	1858,3

El análisis de las muestras de orina recogidas de los trabajadores no detectó la presencia de ninguno de los compuestos citostáticos analizados por encima de los LOD establecidos. Estos resultados obtenidos, a pesar de la evidencia de contaminación en muestras de superficies, pueden ser debidos al adecuado uso de EPIs, principalmente guantes, ya que aunque la información extraída de los cuestionarios individuales fue escasa, se observó que los trabajadores utilizaban frecuentemente guantes para realizar sus tareas (preparación, administración y limpieza).

Se han publicado varios trabajos en los que se evaluó la presencia de citostáticos en la orina de trabajadores, algunos de los cuales utilizaron además un grupo control con trabajadores no expuestos [77; 94; 203; 212; 247], o incluso un doble control con trabajadores del hospital no implicados en el manejo de citostáticos y también controles comunitarios [431]. Asimismo, existen diferencias entre los múltiples trabajos en cuanto al tipo de muestra utilizada, ya que unos recogen muestras puntuales (es decir, una única recogida de muestra) solo al inicio del turno [126], otros al inicio y al final del turno [94; 198-200; 205; 210; 219; 231; 234; 236], otros solo al final

[77; 133; 201; 206; 208; 214; 229; 230; 235; 404], y algunos tras un cierto tiempo al finalizar el turno [178; 211; 221], mientras que otras metodologías recogen orina de 24 horas empezando al inicio del turno [80; 191; 193; 194; 202; 207; 220; 222; 228], a mitad de turno [225; 226; 247] o al finalizar el turno [77; 192; 197; 209; 233], y las analizan de forma separada [193; 202; 203; 207; 209; 232] o combinadas [202; 226]. Por tanto, se recogen diferentes períodos de exposición y diferentes fracciones de fármaco son eliminadas en la orina, por lo que deben realizarse diferentes interpretaciones de los resultados.

La comparación con otros hospitales es compleja debido a las diferentes características de los centros [tipo de hospital, número de camas, tipo de servicio (pacientes ambulatorios, pacientes ingresados), preparación y distribución para otros hospitales], las metodologías de muestreo utilizadas (recogida puntual de muestras, monitorización durante varios días), los diferentes fármacos monitorizados (principalmente ciclofosfamida) y la presentación de los datos (algunos estudios indican las cantidades manejadas durante el día del muestreo, cantidades/varios días, cantidades/semana, cantidades/mes, cantidades/persona), por lo que es difícil equiparar el volumen de trabajo realizado en cada uno de ellos.

Al igual que en el presente trabajo, se han publicado varios artículos en los que no se han detectado ninguno de los fármacos monitorizados (ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato, gemcitabina, antraciclina y/o FBAL) en ninguna de las muestras de orina obtenidas [192; 201; 205; 208; 210; 213; 219; 221; 228; 230; 232; 235]. En la mayoría de ellos se aplicaron parte de las medidas de seguridad recomendadas tales como el uso de CSB o aisladores en tareas de preparación, la existencia de una sala a presión negativa [210], el uso de EPIs como guantes, bata, gorro y máscara, y la utilización de CSDTD y sistemas Luer-lock. No obstante, cabe destacar que, además de las diferentes medidas aplicadas en los distintos hospitales, los LOD/LOQ descritos son muy variables, desde 9 pg/mL [230; 235] hasta 400 pg/mL [213] e incluso 8100 pg/mL [192] para ciclofosfamida, lo que podría explicar la ausencia de resultados positivos en los casos en los que se utilizaron LOD mayores. Por su parte, la ausencia de resultados positivos en los trabajos con menores LOD puede ser debido al alto uso de EPIs por parte de los trabajadores (guantes, bata, máscara, calzas y gorro) más que al uso de otras medidas como CSDTD o sistemas Luer-lock [210; 219; 228; 230; 235].

Por el contrario, han sido numerosas las publicaciones en las que se describe la detección de citostáticos en la orina de trabajadores expuestos. Las cantidades detectadas en muestras de orina puntuales han oscilado entre 43 pg/mL [212] hasta 10031 pg/mL [200] para ciclofosfamida, entre 25 pg/mL [231] y 4221 pg/mL [178] para ifosfamida, entre 220 pg/mL [229] y 2000 pg/mL [204] para metotrexato, entre 5 pg/mL [202] y 33900 pg/mL [214] para doxorubicina, 10 pg/mL [202] y 84100 pg/mL [214] para epirubicina, 35 pg/mL para irinotecán [233], 20 pg/mL [120] y 22700 pg/mL [402] para FBAL, y entre 0,8 pg/mL [243] y 1300 pg/mL [200] para compuestos de platino. Sin embargo, en el caso de platino, dado que este compuesto puede proceder de otras fuentes como implantes dentales y estar presente como contaminante ambiental debido a los gases de escape de los automóviles, se ha establecido un punto de corte de 10 pg/mL, por debajo del cual se atribuye a una exposición no relacionada con el ámbito ocupacional de los trabajadores sanitarios [234]. De hecho, Kopp et al. (2013b) [243] no encontraron diferencias entre los niveles detectados en sujetos expuestos y en controles. Por otro lado, las cantidades excretadas en muestras de orina recogidas durante un período de 24 horas oscilaron entre 2,4 ng [217] y 38230 ng [194].

Los resultados hallados han sido detectados no solo entre el personal en contacto con estos fármacos tales como farmacéuticos, técnicos, enfermeros o incluso médicos encargados de la preparación, o enfermeros y auxiliares responsables de la administración del tratamiento a los pacientes, sino también entre el personal no implicado en el manejo directo de estas sustancias, tales como personal de limpieza del área de trabajo [94; 233], así como el personal encargado de la limpieza del área de pacientes, camilleros, cuidadores y asistentes de atención médica [231]. Hon et al. (2015) [226] han detectado la presencia de fármacos citostáticos en la orina de trabajadores del área de administración no implicados en esta tarea como oncólogos, dietistas, voluntarios y auxiliares de sala. Por otro lado, algunos autores han informado de la presencia de contaminación en la orina de farmacéuticos, enfermeros o técnicos que no habían tenido contacto con los fármacos [80; 94; 193; 202; 207]. Por su parte, Wick et al. (2003) [210] detectaron ifosfamida en la orina de un técnico de farmacia no implicado en tareas de preparación y un farmacéutico encargado de entregar las órdenes de preparación y comprobar las formulaciones, a pesar de que la última preparación de ifosfamida se había realizado 3 semanas antes de la recogida

de muestras. Por su parte, Baniyadi et al. (2018) [94] detectaron ciclofosfamida e ifosfamida en la orina del personal de secretaría. Además, cabe destacar también los trabajos realizados por Ramphal et al. (2014, 2015) [225; 247] en los cuales se detectó la presencia de contaminación en orina de trabajadores de la farmacia principal (en la cual no se preparaban antineoplásicos) tras entrar en la sala de preparación de la farmacia oncológica, e incluso en enfermeros control pertenecientes a distintas áreas no relacionadas con oncología; y el trabajo de Hon et al. (2015) [226], en el cual también se detectaron orinas contaminadas de participantes pertenecientes a otros departamentos donde no se realizaron tareas de preparación o administración (recepción, transporte, nutrición, gestión de material), siendo los que presentaron los mayores niveles. Todo esto sugiere una importante contaminación ambiental que no está confinada exclusivamente a las zonas de preparación o administración, sino que puede incluso expandirse a otras áreas dentro del ámbito hospitalario. Otro aspecto importante a mencionar fue la presencia de contaminación en la orina recogida antes del inicio del turno de trabajo [94; 120; 126; 178; 190; 198; 199], lo que sugiere que la piel puede actuar como un reservorio, lo que daría lugar a una exposición interna prolongada a estos fármacos más allá de la jornada laboral. Esto ha sido demostrado por Sessink et al. (1992) [193], los cuales detectaron cantidades de ciclofosfamida en orina de trabajadores desde 2 horas después hasta incluso 24 horas tras haber comenzado el turno de trabajo. Este hecho podría explicar el motivo por el cual algunos autores no encontraron correlación entre las cantidades manejadas y los niveles detectados [193; 194; 220; 226].

Estos hallazgos, junto con la información aportada por los participantes, sugieren que las medidas de protección utilizadas no son adecuadas. De hecho, algunos autores han observado que el uso de EPIs no cumplió con las recomendaciones establecidas [200; 218], e incluso no utilizaron CSB para realizar tareas de preparación [126; 218]. Las medidas y sistemas de protección utilizados difieren entre los diferentes hospitales, e incluso entre cada categoría profesional o tarea realizada. De esta manera, son más habituales entre el personal responsable de la preparación y de la administración de fármacos (aunque algunos autores detectaron un mayor número de trabajadores positivos [218; 231] así como un menor uso de EPIs [193] entre el personal encargado de la administración de los fármacos en comparación con el personal encargado de su preparación), y menos

frecuentes entre los trabajadores encargados de tareas como manejo de residuos o excretas de pacientes, cuidado de pacientes y recepción y transporte de medicamentos, siendo además menos conscientes del riesgo de exposición. De hecho, Ndaw et al. (2010) [402] detectaron mayor contaminación en orina de auxiliares encargados de estas tareas que en personal de enfermería responsable de la administración de los tratamientos. Por su parte, Sessink et al. (1992) [193] indican que el personal no implicado en la preparación apenas utilizó medidas de protección. Las diferentes medidas varían desde salas de preparación básicas hasta salas limpias con antesala [203; 209; 212], uso de distintos tipos de CSB o aisladores, uso de CSDTD [203; 207; 212; 222], empleo de la técnica de trabajo a presión negativa para evitar fugas de los fármacos desde los viales [220; 247], y distintos tipos de EPIs y en diferente medida según el hospital, la tarea y el trabajador del que se trate. Los guantes fueron los EPIs más frecuentemente utilizados, desde guantes de látex, vinilo o nitrilo, doble par o guantes marcados como resistentes a quimioterapia, seguidos por el uso de bata o algún tipo de ropa protectora y, en menor medida, gorro, calzas, máscaras y gafas. Algunos trabajos informan incluso de la utilización de máscaras quirúrgicas en tareas de preparación [80; 198; 200; 222] o prácticas inadecuadas como no cambiar los guantes frecuentemente [214], según aconsejan las guías [55; 70; 465; 466], o el almacenamiento, preparación y consumo de alimentos y bebidas en las áreas de trabajo [178]. Hama et al. (2012) [215] detectaron ciclofosfamida en la orina de un técnico que no entró en la sala de preparación, pero estuvo encargado de la dispensación de viales de fármacos sin haber utilizado guantes. Sin embargo, a pesar de la aplicación de las distintas medidas de protección (guantes, máscara, bata, CSB, CSDTD), todavía se sigue detectando contaminación entre los trabajadores que preparan y administran los tratamientos [77; 133; 215; 217; 220; 222; 224-226; 229; 231; 233; 402; 404], ya que en algunos casos utilizan EPIs no adecuados como guantes de vinilo o máscaras quirúrgicas, las cuales no ofrecen protección frente a partículas [214; 222; 402], según informan los trabajos publicados desde el año 2010. Por otro lado, también se ha detectado contaminación incluso entre el personal encargado de actividades no relacionadas con las tareas de preparación y administración como trabajadores encargados de la recepción, transporte y dispensación de fármacos, y también voluntarios, oncólogos, ayudantes de sala, dietistas, y trabajadores de otros departamentos donde no se manejan antineoplásicos como personal administrativo, nutrición o gestión de material [215; 226;

231], llegando a encontrarse en ellos las mayores concentraciones en orina. En alguno de estos casos el uso de EPIs fue inexistente [215], lo que explicaría la obtención de resultados positivos. No obstante, algunas publicaciones han descrito una reducción significativa de los niveles de contaminación y del porcentaje de muestras contaminadas tras la implantación de CSDTD [203; 222; 224]. También se ha visto un descenso de la contaminación en orina hasta niveles no detectables en las distintas campañas llevadas a cabo en 5 hospitales italianos desde el año 1998 hasta el 2007 [178]. Las medidas y sistemas de protección utilizados en los hospitales en los cuales no se obtuvieron muestras de orina positivas fueron quizás más extensas en comparación con las medidas utilizadas en hospitales en los cuales se obtuvieron muestras de orina contaminadas. Así, se ha informado del uso de áreas centralizadas diseñadas para realizar tareas de preparación equipadas con antesala y a presión negativa [208; 210; 219], el uso de CSB con extracción total [208; 219; 230], aisladores [205] o sistemas robóticos [228], la aplicación de medidas adicionales como conexiones Luer-lock o la colocación de una hoja desechable en la superficie de trabajo de la CSB [208], uso de CSDTD [219; 232], la aplicación de técnicas de trabajo a presión negativa [208], el embolsado de las formulaciones antes de salir de la CSB [210], y el mayor uso de EPIs [208; 210; 230; 232; 235]. Sin embargo, estas medidas no fueron exclusivas de estos hospitales sino que también se registró el uso de CSB de extracción total [200; 203; 209; 212; 222; 247], el uso de hoja desechable en CSB [220; 224], y la técnica de trabajo a presión negativa [220; 247] en hospitales en los cuales se ha demostrado contaminación en la orina de los trabajadores, lo que sugiere que la existencia de medidas de protección no es suficiente para evitar la contaminación, sino también las buenas prácticas de trabajo y la predisposición del personal a actuar de manera responsable.

Por tanto, la utilización de sistemas de protección colectivos tales como áreas especialmente acondicionadas para la preparación de fármacos antineoplásicos y sistemas de contención como CSB o aisladores y CSDTD, y la utilización correcta de medidas de protección individuales, junto con los programas de entrenamiento y concienciación de todo el personal en contacto (directo o indirecto) con estos fármacos, la elaboración de protocolos de trabajo, y la realización de campañas de monitorización periódicas para mantener el nivel de alerta en cuanto al riesgo de exposición, constituyen las medidas a seguir para lograr reducir la contaminación a los

niveles más bajos posibles, lo que en términos de monitorización ambiental se conoce como el principio ALARA.





**VI. EXPERIMENTAL PART (3). "IN VITRO" EVALUATION OF  
EXPOSURE TO CYTOSTATIC DRUGS IN DNA DAMAGE  
AND REPAIR IN THE U-937 CELL LINE**



## 6.1. Materials and methods

### 6.1.1. Instrumentation

- Biological safety cabinet class II Aura 2000 M.A.C (BioAir Instruments, Pero, MI, Italy)
- Incubator at T=37°C and 5% CO<sub>2</sub> Galaxy R (Wolf Laboratories Ltd., Pocklington, York, UK)
- Heater for culture medium
- Autoclave Tactrol 2 (Priorclave Ltd., London, UK)
- Microwave
- Optical microscope Leica DMIL (Leitz Instruments Ltd., Germany)
- Fluorescence microscope Leica DMRB (Leitz Instruments Ltd.)
- Haemocytometer (Neubauer Brand™, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Vortex
- Thermostatted centrifuge (4°C) adapted to Eppendorf® tubes
- Electrophoresis tank Gibco™ Brl Horizontal gel electrophoresis apparatus Horizon 20.25 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- Electrophoresis power supply Consort E831
- Thermostatted bath (37-40°C)
- Granatario scale
- Magnetic shaker

### 6.1.2. Materials

- Universal® tubes Fisherbrand™ (ThermoFisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA)
- Eppendorf® tubes
- Fully frosted slides
- Coverslips 18 x 18 cm (ThermoFisher Scientific)
- Black staining jars (MilliporeSigma, Saint Louis, MO, USA)
- 6 and 96 well-plates
- Sterile culture flasks (25 cm<sup>2</sup> and 75 cm<sup>2</sup>) (Fisherbrand™)
- Sterile serologic pipettes (10, 25 and 50 mL) (Fisherbrand™)
- Automatic pipettes (INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Switherland)
- Graduated cylinder and glass beakers

### **6.1.3. Solvents, chemicals, certified reference materials**

#### **6.1.3.1. Solvents**

- Methanol (ThermoFisher Scientific)
- Dimethylsulfoxide (DMSO) (Millipore, Burlington, MA, USA)

#### **6.1.3.2. Chemicals**

- Sodium hydroxide (ThermoFisher Scientific)
- Tris base (ThermoFisher Scientific)
- Sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (ThermoFisher Scientific)
- Sodium chloride (ThermoFisher Scientific)
- Triton-X (ThermoFisher Scientific)
- Hydrogen peroxide 30% (Millipore)
- Methyl methanesulfonate (MMS) 11,69 M (Millipore)
- Hydrochloric acid (ThermoFisher Scientific)
- Saline phosphate buffer (PBS) (Millipore)
- Low molecular weight agarose (LMP) (Invitrogen, CA, USA)
- High molecular weight agarose (HMP) (Invitrogen)
- 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (MilliporeSigma, Saint Louis, MO, USA)
- Cyclophosphamide (CP) (MilliporeSigma)
- 5-Fluorouracil (5-FU) (MilliporeSigma)
- Etoposide (ETP) (MilliporeSigma)
- Cisplatin (Cis-Pt) (MilliporeSigma)

#### **6.1.3.3. Culture medium**

A culture medium RPMI-1640 (ATCC 30-2001) (ATCC, Manassas, VA, USA) (ThermoFisher Scientific) supplemented with fetal bovine serum (10%) (ATCC 30-2020) (Gibco™, ThermoFisher Scientific), penicilline/streptomycine (1%) (ThermoFisher Scientific) and sodium pyruvate (1%) (100 mM, ThermoFisher Scientific) was used. The medium was stored at 4°C.

#### **6.1.3.4. Cell line U-937**

The “*in vitro*” assays in this study were performed using the U-937 cell line (ATCC® CRL-1593.2™) from a histiocytic lymphoma of a 37-year-old male. Cells are characterized by monocyte morphology and growth in suspension

[467; 468]. Experiments were performed with cells from passage 12 (P-12) to passage 36 (P-36).

#### **6.1.4. Solutions**

##### **6.1.4.1. Cytostatic drug solutions**

Stock solutions from the certified solid standards were prepared in methanol at 10 mg/mL, 6.6 mg/mL and 5 mg/mL for cyclophosphamide, 5-fluorouracil and etoposide, respectively, and in DMSO at 10 mg/mL for cisplatin. Working solutions at 40 µg/mL were prepared by further dilution of the stock solutions with the appropriate solvent.

##### **6.1.4.2. Hydrogen peroxide solutions (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

- Solution A (0.1 M): addition of 10.21 µL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 989.79 µL of deionized water.
- Dilution B (1 mM): 10 µL of solution A in 990 µL of PBS.

These solutions should be freshly prepared each day.

##### **6.1.4.3. Methyl methanesulfonate (MMS) solutions**

- Solution A (1000 mM): 4 µL of commercial MMS 11.69 M in 42.76 µL of DMSO.
- Solution B (5 mM): 5 µL of solution A in 995 µL of culture medium.

These solutions should be freshly prepared each day.

##### **6.1.4.4. Comet assay (SCGE) solutions**

- 6.1.4.4.1. 10 M Sodium hydroxide solution: 200 grams of sodium hydroxide in 500 mL deionized water. Stored at room temperature.
- 6.1.4.4.2. Stock neutralization solution (2 M Tris): 242.3 grams of Tris base in 1 L of deionized water. Stored at room temperature.
- 6.1.4.4.3. Sodium salt EDTA solution (0.2 M): 14.89 grams of sodium EDTA in 200 mL of deionized water. Stored at room temperature.

- 6.1.4.4.4. Stock lysis solution (2.5 M NaCl + 0.1 M EDTA + 10 mM Tris): 292.2 grams of sodium chloride, 74.45 grams of EDTA and 10 mL of 2 M Tris solution in 2 L of deionized water. Adjust with 10 M NaOH solution to pH 10.
- 6.1.4.4.5. Working lysis solution: 400 mL of stock lysis solution and 4 mL of Triton-X. Shake for 20 minutes and stores at 4°C. This solution should be freshly prepared each day.
- 6.1.4.4.6. Electrophoresis solution (0.3 M NaOH + 1 mM EDTA): 60 mL of 10 M NaOH 10 M solution and 10 mL 0.2 M EDTA solution in 2 L of deionized water. Stored at 4°C.
- 6.1.4.4.7. Working neutralized solution (0.4 M Tris): 400 mL of stock buffer in 2 L of deionized water. Adjust to pH 7.5 with concentrated hydrochloric acid.
- 6.1.4.4.8. Saline phosphate buffer (PBS): 5 tablets of PBS in 500 mL of Milli-Q water. Autoclave for sterilization.
- 6.1.4.4.9. Low molecular weight agarose (LMP) 1%: 100 mg of LMP agarose in 10 mL of PBS buffer. Heat in microwave until complete dilution.
- 6.1.4.4.10. High molecular weight agarose (HMP) 1%: 100 mg of HMP agarose in 10 mL of PBS buffer. Heat in microwave until complete dilution.
- 6.1.4.4.11. DAPI dye solution at 5 mg/mL: 10 mg DAPI in 2 mL of deionized water.
- 6.1.4.4.12. DAPI dye solution at 1 mg/mL: 10 µL of DAPI solution at 5 mg/mL in 50 mL of deionized water.

### 6.1.5. Experimental design

The objective of this study was to evaluate the potential cytotoxic and genotoxic effect of the exposure to a selection of cytostatic drugs (cyclophosphamide, 5-fluorouracil, etoposide and cisplatin) commonly used in Spanish hospitals, after different exposure times, using an “*in vitro*” experimental model of human monocytic cells.

### 6.1.5.1. Routine culture of U-937 cells

#### 6.1.5.1.1. Cells recovery from liquid nitrogen

Cells were stored in a liquid nitrogen tank at a temperature of  $-130^{\circ}\text{C}$ . To recover and condition the cells, a vial was selected in P-12 and rapidly thawed in a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ . Under aseptic conditions, 6 mL of supplemented culture medium was added to a  $25\text{ cm}^2$  flask and the content of the vial was transferred to the flask. Finally, it was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  for 24 hours. The cells were subsequently centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes in a Universal<sup>®</sup> tube, the supernatant discarded, and again 6 mL of culture medium were added. Cells were transferred to a new  $25\text{ cm}^2$  flask.

#### 6.1.5.1.2. U-937 cells subculture

Since the cells have a high growth rate, to maintain an adequate cell density and renew the culture medium, subculture was performed every 3-4 days. For this, the cells in suspension were collected and transferred to a Universal<sup>®</sup> tube for centrifugation at 1500 rpm for 5 minutes. The supernatant was then discarded, and 5-10 mL of fresh culture medium was added depending on the size of the pellet. Subsequently, the cell number was counted using a hemocytometer, for which 20  $\mu\text{L}$  of the cell suspension was deposited and covered with a coverslip. The hemocytometer consists of 2 counting chambers each divided into 4 squares of 1 mm x 1 mm, and was designed in such a way that the distance between the coverslip and the chamber was 0.1 mm thick, so the volume in each square was 1 mm x 1 mm x 0.1 mm =  $0.1\text{ mm}^3 = 10^{-4}\text{ mL}$ .

The cell density or number of cells per unit volume was determined by counting the cells within the 4 squares with the aid of an optical microscope. Cell concentration is the coefficient between the mean number of cells in the 4 squares ( $N$ ) and the volume of the cell suspension contained in the squares:

$$\text{Cell density} = \frac{N}{V} = \frac{n^{\circ} \text{ cells}}{10^{-4} \text{ mL}} = n^{\circ} \text{ cells} \times 10^4 \text{ cell/mL}$$

Once the volume necessary to obtain a density of  $1 \times 10^6$  cells in 15 mL has been determined, it was added in a  $75\text{ cm}^2$  flask and made up to 15 mL with supplemented culture medium.

### 6.1.5.2. Cell viability

#### 6.1.5.2.1. Experiments

The effect that the exposure to cytostatic drugs has on cell viability (cytotoxic damage) was studied using the MTS assay.

Firstly, the effect on cell viability of the solvents used in the preparation of working solutions of cytostatic drugs (methanol and DMSO) was determined. For this, the cells were cultured with different concentrations of methanol and DMSO, from 0.0025% to 1%, for 4 hours and 1 week in 96-well plates. Twelve biological replicates were made for each concentration level and exposure time, and concentration for which no significant decrease in the number of cells with respect to the control (without solvent) was selected. Next, the viability of the cells was evaluated after individual exposure to the four cytostatic drugs between 1-1000 pg / mL for 4 hours; and for cyclophosphamide also at higher concentrations (100, 1000, 10000, and 100000 pg/mL) for one week. In both cases, 12 biological replicates were made for each concentration level.

#### 6.1.5.2.2. Assay protocol

MTS assay protocol was made in several days:

- Day 1
  - Seed 25,000 cells per well in 96-well plates.
  - Fill each well with culture medium until a final volume of 100  $\mu$ L.
  - Incubate at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 24 hours.
- Day 2
  - Prepare working solutions of the compound to be evaluated using culture medium as solvent.
  - Add 100  $\mu$ L of the corresponding solution to each well.
  - Incubate for 4 hours or 1 week.
  - After the incubation time, add 20  $\mu$ L of MTS solution in the dark.
  - Homogenize each well.
  - Cover the culture plate with aluminium foil to avoid exposure to light and incubate for 3 hours at 37°C/5% CO<sub>2</sub>.
  - Measure absorbance at 490 nm.

### 6.1.5.3. DNA damage

#### 6.1.5.3.1. Evaluation of genomic stability of cells

Before starting the genotoxic damage experiments, cells were subjected to an oxidizing agent, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), to determine the concentration of the oxidizing agent that causes cell damage, which would be used as a positive control in the different experiments.  $H_2O_2$  concentrations from 0 to 500  $\mu M$  were evaluated. To do this, a suitable culture volume was extracted to obtain a density of  $5 \times 10^4$  cells, an Eppendorf® tube was deposited with the corresponding volume of 1 mM  $H_2O_2$  solution and completed with PBS up to 1 mL. After centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes at 4°C and the supernatant was removed. The next stage for preparing the gels and all subsequent stages were carried out following the protocol described in the section 1.1.4.3.3.

#### 6.1.5.3.2. Experiments

In order to evaluate the damage caused by cytostatic drugs to the genetic material, the comet assay technique was used, and genotoxic damage was determined by detecting DNA strand breaks. The cells were cultured in 6-well plates and were exposed to different concentrations of the cytostatic agents during different incubation periods, leading to 5 different experiments:

- 1- Concentrations of 100, 1000 and 10000 pg/mL for the 4 cytostatic drugs (individually) for 4 hours.
- 2- Concentrations of 100, 1000 and 10000 pg/mL for the 4 cytostatic drugs (all together) for 4 hours.
- 3- Concentrations of cyclophosphamide at 100, 1000 and 10000 pg/mL for 48 hours.
- 4- Concentrations of cyclophosphamide at 100, 1000 and 10000 pg/mL for 1 week.
- 5- Concentrations of cyclophosphamide at 20000, 50000 and 100000 pg/mL for 48 hours.

In each experiment, a negative control (without the cytostatic compound but with the same amount of the cytostatic dilution solvent used in the experiment) and two positive controls (one with 10 mM  $H_2O_2$  and

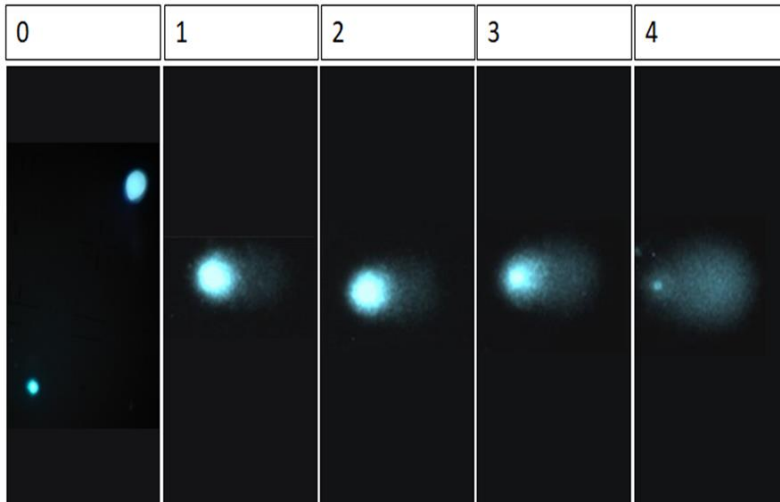
exposure for 5 minutes; and another with 0.2 mM MMS and exposure for 30 minutes) were included.

In all experiments, except for experiment 1, three biological replicates were performed with 2 technical replicates each. In experiment 1, carried out on 2 different days, 4 biological replicates were performed with 2 technical replicates each one.

#### **6.1.5.3.3. Assay protocol**

- Perform subculture, count the number of cells and take an adequate volume to seed  $2 \times 10^5$  cells per well in 6-well plates. Fill each well with culture medium to a final volume of 3 mL.
- Incubate at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 24 hours.
- Prepare the different working solutions of the cytostatic drugs using culture medium as solvent.
- Add 30 µL of the corresponding solution to each well.
- Incubate for 4 hours, 48 hours or 1 week.
- Count the number of cells in one of the wells and determine the volume necessary to obtain  $5 \times 10^4$  cells.
- Preparation of the gel: a first layer of agarose was prepared on a slide by depositing 85 µL of 1% HMP agarose in PBS. Immediately cover with a coverslip and allow to solidify for 5-10 minutes in a refrigerator at 4°C. The previously calculated cell volume was added to an Eppendorf® tube and centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant was removed and the pellet with the cells was resuspended in 85 µL of 1% LMP agarose in PBS. This second agarose layer was then deposited with the cells on the first agarose layer, covered with a coverslip and allowed to solidify for 5-10 minutes at 4°C.
- Cell lysis: carefully remove the coverslips, place the gels in opaque staining jars, add working lysis solution previously conditioned at 4°C, and leave for at least one hour at 4°C.
- Alkaline treatment: add the electrophoresis solution to the electrophoresis tank and place the slides. Incubate for 40 minutes.
- Electrophoresis: carried out at a constant voltage of 25 volts and 999 milliAmps for 40 minutes.
- Neutralization: wash 3 times for 5 minutes with neutralization solution at 4°C.
- Staining: add 20 µL of 1 µg / mL DAPI fluorescent dye to each gel.

- Scoring: perform visual scoring using a fluorescence microscope. A visual scale was used that scores the different levels of damage with values from 0 (no damage) to 4 (maximum damage) according to the size and shape of the tail. The score obtained after evaluating 100 cells per gel was presented in arbitrary units (AU) and its values were between 0 and 400 AU. **Figure 8** shows the different scores of the comets.



**Figure 8:** Arbitrary units assigned to the different comets in the SCGE assay according to the size and shape of the tail from 0 (undamaged) to 4 (maximum damage).

#### 6.1.5.4. DNA damage repair

##### 6.1.5.4.1. Experiments

The determination of the DNA repair capacity of cells after exposure to known concentrations of cyclophosphamide (1000, 10000 and 100000 pg/mL) during an exposure time of 4 hours and 1 week was performed using a modification of the comet assay. In this modification, cells were exposed to a damage-inducing agent, MMS, which causes alkylating damage, at a concentration of 0.4 mM for 30 minutes, and damage repair kinetics was monitored at different times. The cells were seeded in 6-well plates and exposed to 4 concentrations of cyclophosphamide in triplicate (0, 1000, 10000 and 100000 pg/mL).

For each concentration, two replicates of the cells were exposed to the MMS alkylating agent dissolved in culture medium for 30 minutes, while the other replicate was not exposed to MMS (UT). In turn, a part of the cells exposed to the alkylating agent were analysed by the comet assay immediately after incubation with the agent (T0), while the remaining cells were allowed to start the repair process and for this, the culture medium was changed and cells were incubated again at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 30 minutes before being analysed by the comet assay (T30). Two biological replicates were made with 2 technical replicates for each concentration level and exposure time, except at 10000 pg/mL, for which 4 biological replicates were made with 2 technical replicates each one.

#### **6.1.5.4.2. Assay protocol**

The same steps and procedure were carried out as in the case of the standard comet test (see section 1.1.4.3.3), but a small modification was introduced. A part of the cells treated with the MMS alkylating agent were incubated again at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 30 minutes in the presence of fresh culture medium to allow repair of the damage caused.

#### **6.1.6. Statistical analysis**

Statistical analysis was made with IBM SPSS version 25 software. Normality of the data and the equality of variances are two essential requirements for the use of parametric tests such as the T-Student statistical test and the analysis of variance (ANOVA). The normality of the data was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and the Shapiro-Wilk test. If the normality of the data could be assumed, the T-Student test for comparison of means was applied for related data.

When the data did not follow a normal distribution, an attempt was made to achieve the fit to a normal distribution by means of the logarithmic transformation, square root or inverse of them. If after this modification the normality requirements are fulfilled, the parametric tests mentioned above were applied.

If any of the aforementioned requirements could not be assumed, it was necessary to resort to non-parametric tests in order to perform the desired contrasts. In this case, the Wilcoxon W test for comparison of means was used for related data.

## 6.2. Results and discussion

The evaluated cytostatic drugs concentrations were based on the existing literature. To do this, the concentrations in the blood of the exposed workers were estimated from the concentrations observed in the blood and urine of patients and extrapolating the results to the urine of the workers, since there are no studies in which a direct determination of blood concentrations has been made in exposed workers.

Based on the study carried out by Hedmer et al. (2008) [469], in which they determine the plasma and urinary cyclophosphamide concentrations in cancer patients at different times, and taking the results of measurements made between 20-46 hours after treatment, the patients plasma/urine ratio was estimated. This ratio was then applied to the concentration range observed in different articles in the urine of exposed workers [178; 199; 200; 202; 212; 218; 231]. The results obtained estimate a plasma concentration of cyclophosphamide between 1 and 1000 pg/mL in exposed workers after 20-46 hours from the last contact with the drug.

The estimation of plasma concentrations for the other cytostatic drugs evaluated (5-fluorouracil, etoposide and cisplatin) was more complicated due to the lack of studies indicating the concentrations detected in the urine of patients (in the case of etoposide), to the additional complexity of estimating 5-fluorouracil from its metabolite (FBAL) in urine and, in general, to the lower number of publications both in patients and workers. Therefore, the same concentration range was used for the 4 compounds.

### 6.2.1. Cell viability

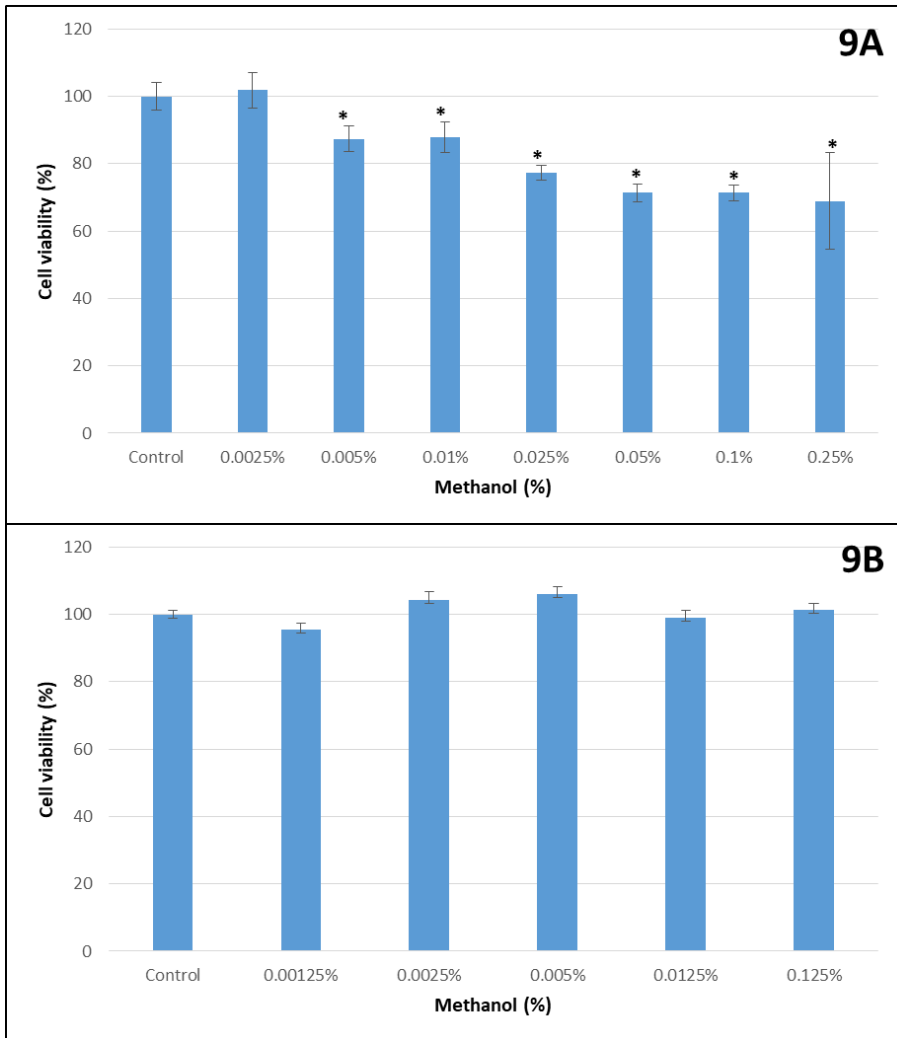
The methanol concentration that did not produce statistically significant damage to cell integrity during a 4-hour exposure period was 0.0025%, since cell growth was similar to that of the control group ( $p$  value  $>0.05$ ). The DMSO concentration that did not produce significant damage was not determined in this study since it was evaluated in previous works, and established at 1%; however, it was decided to use the same concentration as for methanol (0.0025%). Likewise, the effect of solvents was evaluated after a prolonged exposure period (1 week), and it was observed that a methanol concentration of 0.0025% did not produce statistically significant differences in cell viability with respect to that observed in the control group

(p value >0.05). **Figure 9** shows the results obtained for the different concentrations of methanol after 4 hours and 1 week of exposure.

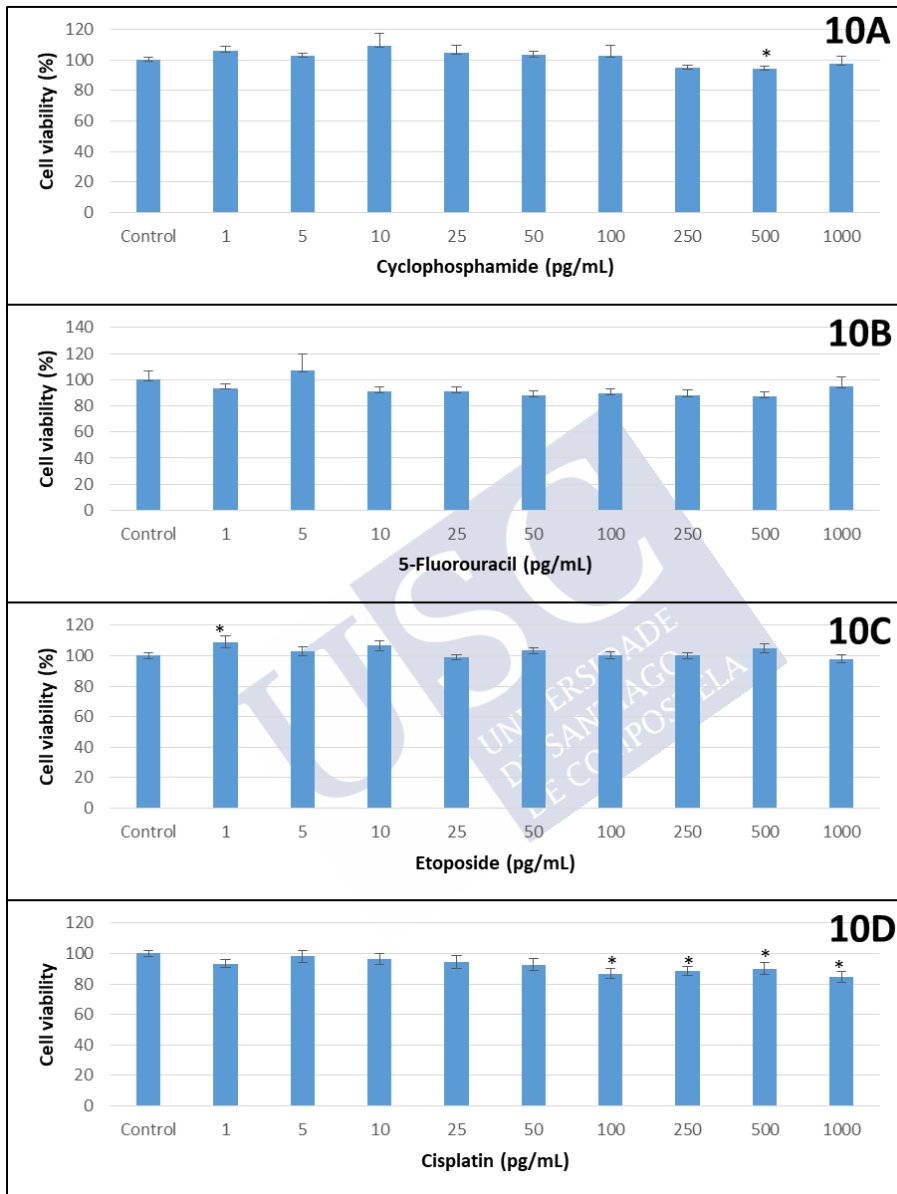
The exposure of cells to 1-1000 pg/mL of the 4 cytostatic drugs during an exposure time of 4 hours gave different results depending on the compound, although viability was greater than 80% with respect to the control in all cases (**Figure 10**). Specifically, for 5-fluorouracil, no statistically significant differences were obtained between the different concentrations evaluated. In the case of cyclophosphamide, a statistically significant difference was observed in the percentage of viability at a concentration of 500 pg/mL with respect to the control group, although a higher concentration (1000 pg/mL) did not produce significant differences. On the other hand, the lowest etoposide concentration (1 pg/mL) showed a statistically significant higher percentage of viability with respect to the control, but no significant differences were observed at higher concentrations. Finally, statistically significant differences were observed at the highest concentrations for cisplatin (100, 250, 500 and 1000 pg/mL) compared to the control group.

Finally, the effect on cell viability of cyclophosphamide at higher concentrations (100-100000 pg/mL) for 1 week was studied. The percentage of viability only showed statistically significant differences with respect to the control at the lowest concentration (100 pg/mL) (**Figure 11**). The significant differences found in these experiments may be due to the dispersion of the results obtained and/or their low statistical power.

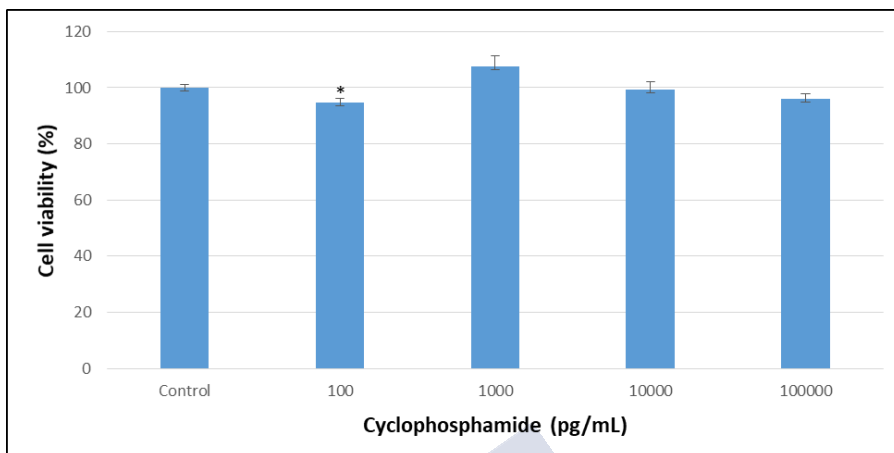
Experimental part (3). "In vitro" evaluation of exposure to cytostatic drugs in DNA damage and repair



**Figure 9:** Assessment of cell viability after exposure to different concentrations of methanol for 4 h (9A) and 1 week (9B). Statistical significance: \*  $p < 0.05$  versus control (T-Student test).



**Figure 10:** Assessment of cell viability after exposure to different concentrations of cyclophosphamide (10A), 5-fluorouracil (10B), etoposide (10C) and cisplatin (10D) for 4 hours. Statistical significance: \*  $p < 0.05$  versus control (Wilcoxon test).



**Figure 11:** Assessment of cell viability after exposure to different concentrations of cyclophosphamide for 1 week. Statistical significance: \*  $p < 0.05$  versus control (Wilcoxon test).

### 6.2.2. DNA damage

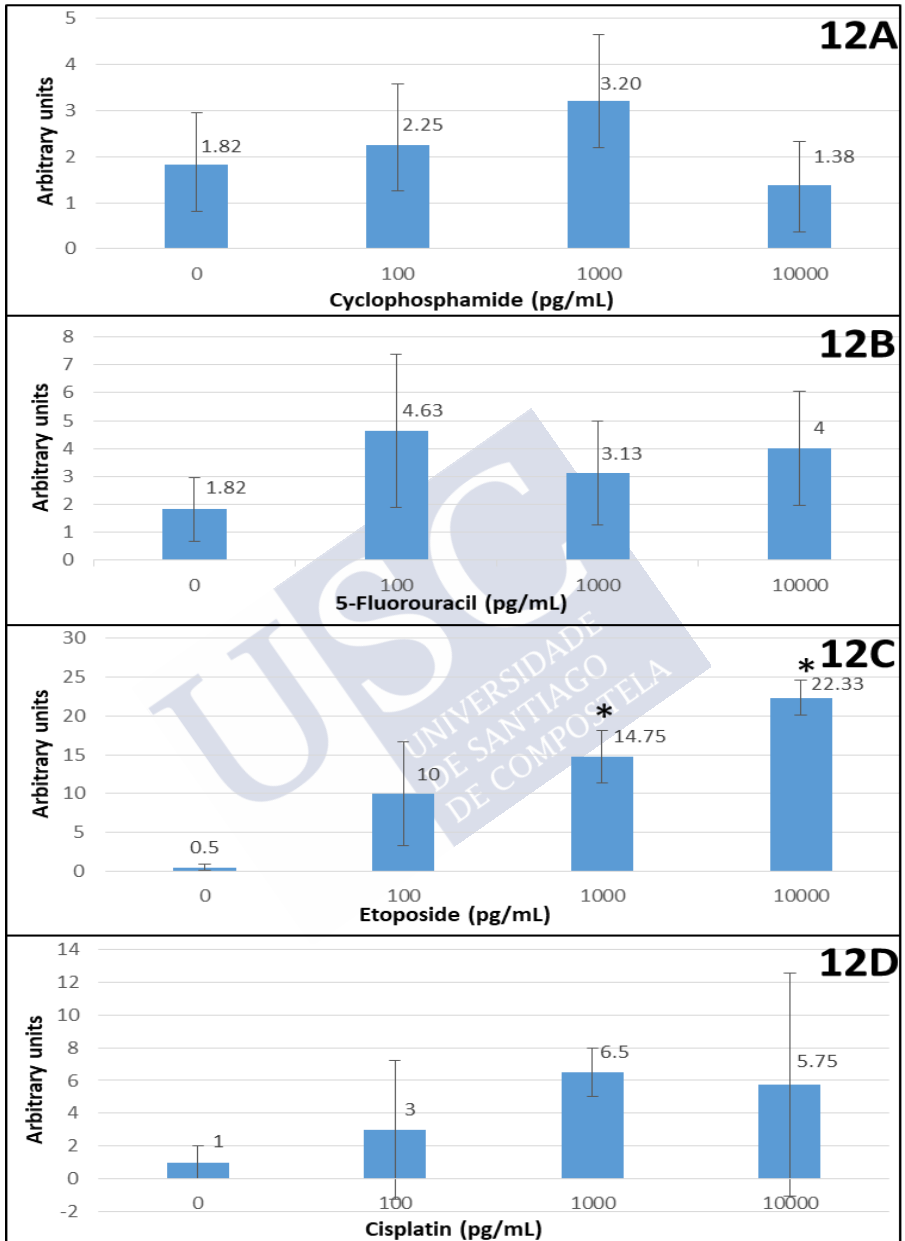
The tests carried out individually with cyclophosphamide, 5-fluorouracil and cisplatin at concentrations of 100, 1000 and 10000 pg/mL did not show significant differences with respect to the control group ( $p > 0.05$ ). However, exposure to etoposide showed significant differences compared to the control group at concentrations of 1000 and 10000 pg/mL. **Figure 12** shows the results obtained for the 4 drugs individually. On the other hand, the exposure to the combination of the 4 drugs was evaluated, although this combination did not lead to statistically significant differences between the different concentrations tested and the control group (**Figure 13**).

Given that the exposure to the different drugs and their combinations did not produce a statistically significant effect, with the exception of etoposide, and since for cyclophosphamide there was greater knowledge about the possible concentrations in the workers' blood, it was decided to carry out subsequent experiments using only cyclophosphamide at the same concentrations (100, 1000 and 10,000) for a longer exposure time (48 hours and 1 week), and at higher concentrations (20,000, 50,000 and 100,000 pg/mL) for 4 hours of exposure. However, in none of the cases were obtained

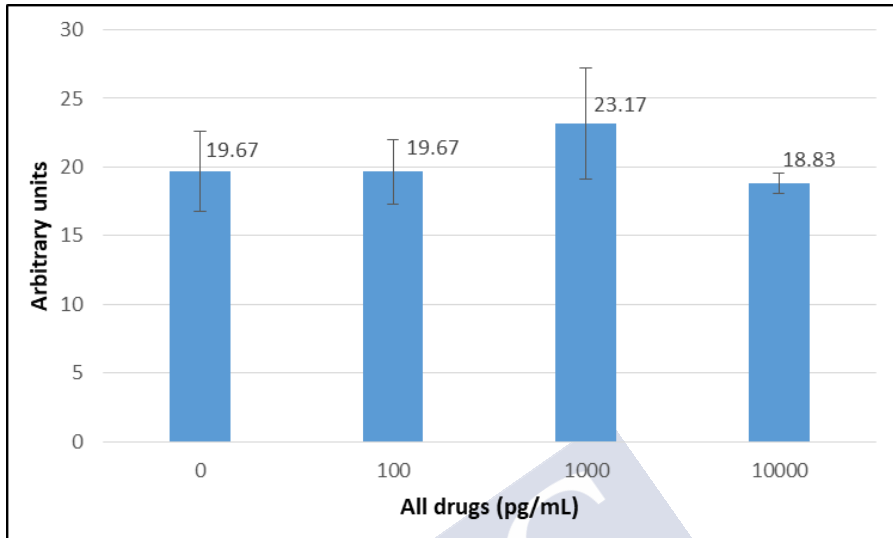
statistically significant differences with respect to the control group. **Figure 14** reflects these results.



Experimental part (3). "In vitro" evaluation of exposure to cytostatic drugs in DNA damage and repair

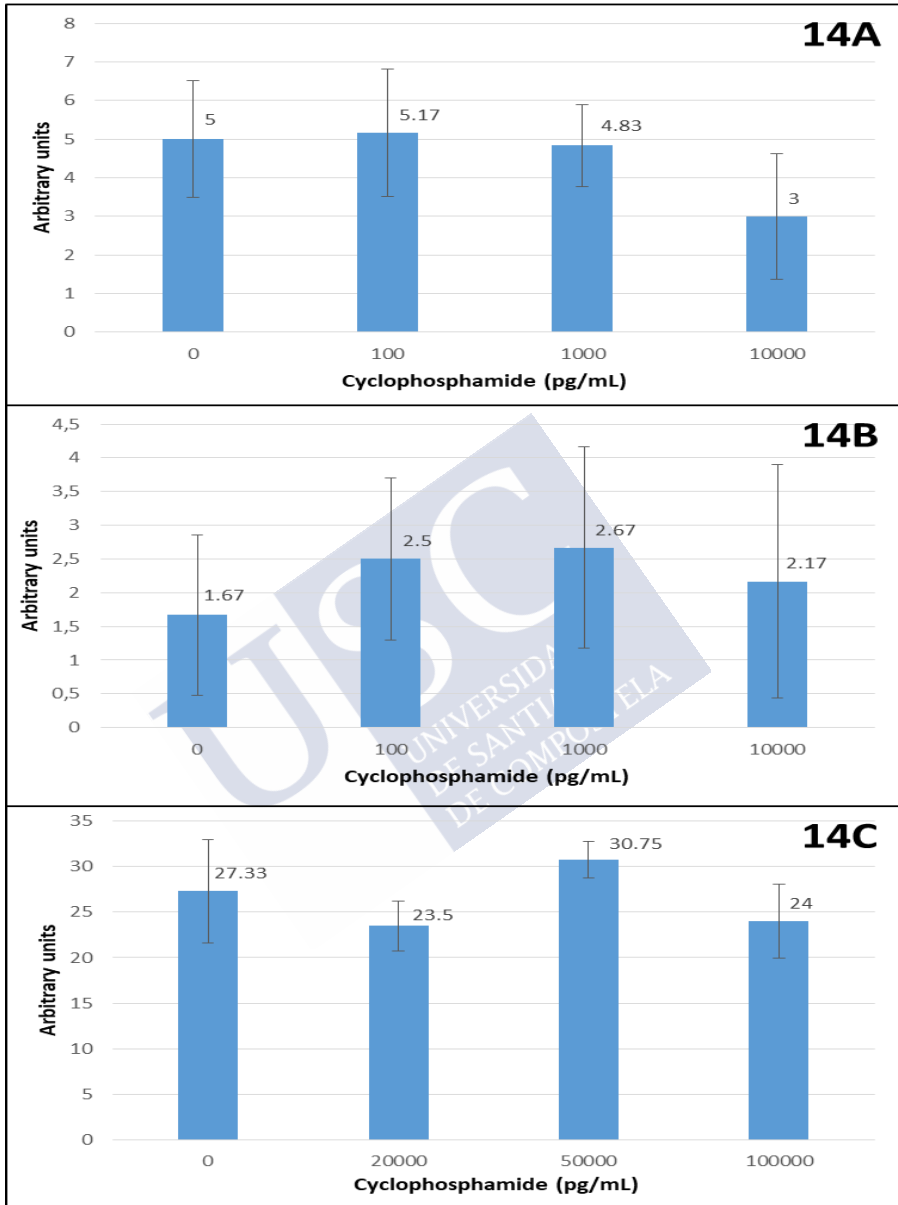


**Figure 12:** Induction of DNA damage after exposure to different concentrations of cyclophosphamide (**12A**), 5-fluorouracil (**12B**), etoposide (**12C**) and cisplatin (**12D**) for 4 h using the alkaline comet assay. Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test).



**Figure 13:** Induction of DNA damage after exposure to a mixture of cyclophosphamide, 5-fluoruracil, etoposide and cisplatin at different concentrations for 4 h using the alkaline comet assay. Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test).

Experimental part (3). "In vitro" evaluation of exposure to cytostatic drugs in DNA damage and repair



**Figure 14:** Induction of DNA damage after exposure to different concentrations of cyclophosphamide for 48 h (14A) and 1 week (14B), and after exposure to increased concentrations of cyclophosphamide for 4 h (14C). Statistical significance:  $p > 0.05$  (T-Student test) (14A);  $p > 0.05$  (Wilcoxon test) (14B and 14C).

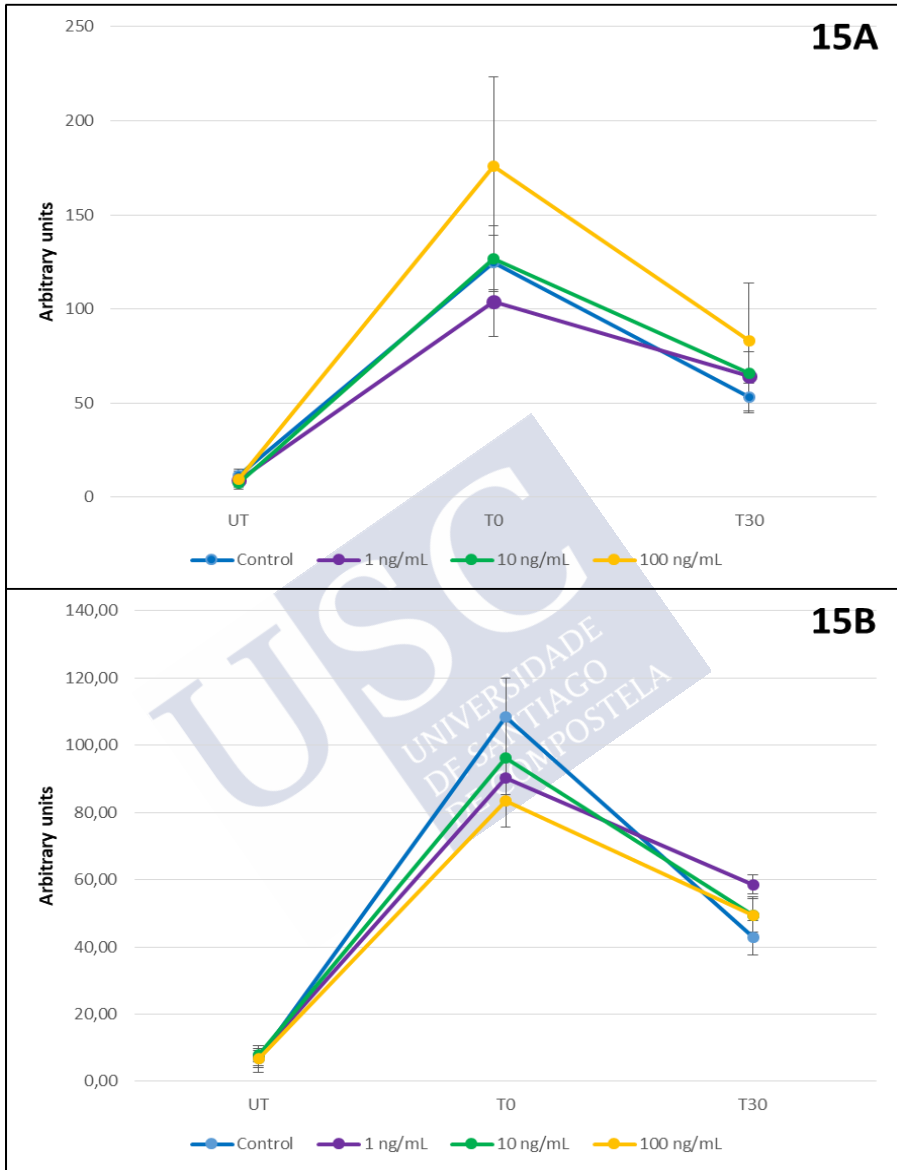
### 6.2.3. DNA damage repair

These experiments made it possible to determine the damage repair kinetics by calculating the repair ratio after exposure of the cells to the cyclophosphamide for 4 hours and 1 week at 1000, 10000 and 100000 pg/mL. DNA damage was produced using MMS and it was determined whether exposure to the cytostatic drug accelerates or slows the rate of cell repair.

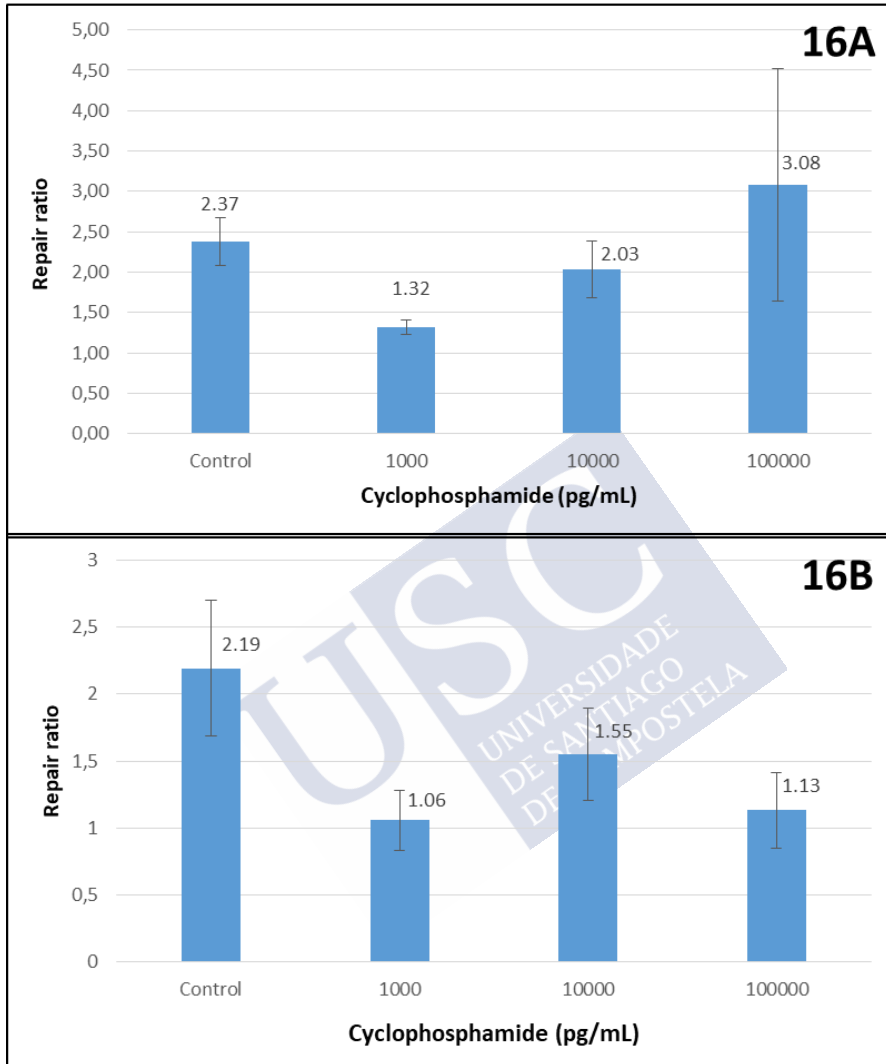
After 4 hours of exposure to the different concentrations of cyclophosphamide, the results obtained did not show statistically significant differences in the DNA damage of the cells immediately after exposure to MMS (T0), nor after 30 minutes of repair (T30) compared to the negative control. Furthermore, the repair rate of the cells exposed to the different concentrations of cyclophosphamide was not statistically significant with respect to the control group.

Exposure of cells to different concentrations of cyclophosphamide for 1 week did not show significant differences with respect to the control, both immediately after exposure to MMS (T0) and after 30 minutes of repair (T30). The repair rate of cells exposed to different concentrations of cyclophosphamide was also not statistically significant compared to the control. However, a non-significant decrease in the repair rate was observed after 1 week of exposure compared to 4 hours of exposure.

**Figure 15** shows the results obtained in the repair test after 4 hours and 1 week of exposure. **Figure 16** indicates the repair ratio at the different concentrations of cyclophosphamide after 4 hours and 1 week of exposure.



**Figure 15:** DNA repair after exposure to cyclophosphamide at different concentrations for 4 h (**15A**) and 1 week (**15B**), combined with exposure to MMS for 30 minutes, using the alkaline comet assay. Cells were evaluated after treatment with cyclophosphamide (UT), after 30 minutes of additional incubation with MMS (T0), and after a 30 minutes drug-free incubation period (T30). Statistical significance:  $p > 0.05$  (T-Student test) (15A). Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test) (15B).



**Figure 16:** DNA repair ratio after exposure to different concentrations of cyclophosphamide for 4 h (**16A**) and 1 week (**16B**), combined with exposure to MMS for 30 minutes, and after an additional 30 minutes drug-free incubation period. Statistical significance:  $p > 0.05$  (Wilcoxon test).

The results obtained in this chapter only show a statistically significant increase in DNA damage "in vitro" after exposure to etoposide at 1000 and 10000 pg/mL for 4 hours compared with control samples not exposed to the drug ( $p < 0.05$ ). This is in accordance with its mechanism of action as a topoisomerase inhibitor, and with the results found by Azqueta & Collins (2013) [333] in a study in a human-derived lymphoblastoid cell line where etoposide induces a dose-dependent increase in strand breaks at non-cytotoxic concentrations.

The absence of significant damage with the other antineoplastic drugs may be explained by different reasons. Firstly, cyclophosphamide (a bifunctional alkylating agent) and cisplatin (a platinum compound that interacts directly with DNA causing DNA-DNA and DNA-protein crosslinks [470]) are known crosslinking antineoplastic agents that induce intra- and inter-strand crosslinks in the DNA chain. Crosslinking agents covalently bind to DNA and prevent separation of both strands during critical cells stages such as replication and transcription, disrupting DNA synthesis and leading to cell death [471; 472]. The presence of inter- and intra-strand crosslinks increase the molecular weight of DNA containing breaks, decreasing the amount of free DNA fragments, and preventing DNA loops from extending, thus reducing the ability of DNA fragments to migrate during electrophoresis retarding its migration towards the anode [133; 333; 372; 377; 471]. Several articles support these statements since some authors have exposed human peripheral blood lymphocytes to a damage inductor agent (MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or radiation) and also treated the cells with different concentrations of crosslinking agents such as cisplatin, showing a significant reduction of migration [376; 377; 473]. Secondly, cyclophosphamide is a prodrug that needs metabolic activation to exert its effect, so the cell line U-937 may be metabolically inactive or with deficiencies to activate the drug. Thirdly, the concentrations tested were too low to induce a measurable damage in cell line compared to control cells without the drug. Thus, in the experiments conducted by Gajski et al. (2016) [470], they assessed concentrations of 5-fluorouracil, etoposide and cisplatin, individually, between 0.01 and 10 µg/mL during an exposure time of 4, 24 and 48 hours. The results obtained by these authors showed a significant increase in DNA migration in human peripheral blood lymphocytes only for etoposide at the highest concentration after 48 hours of exposure, which indicates that strand breaks are not detected by the traditional comet assay at these concentrations or

that another type of damage is produced but not detected. Another experiments carried out by Gajski et al. (2016, 2018) [330; 331] in which evaluated mixtures of antineoplastic drugs (including 5-fluorouracil, etoposide and cyclophosphamide), showed a statistically significant increase in DNA damage only at concentrations of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 4 and 24 hours of exposure using the alkaline comet assay. However, applying the Fpg-comet assay (which uses a specific enzyme to detect oxidized purines and therefore oxidative damage) a statistically significant increase in oxidative damage was observed at lower concentrations (1 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after 4 and 24 hours of exposure, respectively.

The cytotoxicity of several antineoplastic drugs or mixtures of them have been studied in previously published articles. However, comparison with the present study is difficult due to several differences such as the cell type used (human lymphocytes or different cell lines), the antineoplastic drugs assessed or the assay employed for the evaluation (MTT assay, differential staining with orange acridine/ethidium bromide or trypan blue exclusion assay). Gajski et al. (2016, 2018) [330; 331] have published two studies where they evaluated mixtures of 5-fluorouracil, etoposide and imatinib; and 5-fluorouracil, cyclophosphamide and paclitaxel using peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers, respectively. The results obtained showed a significant decrease in cell viability at concentrations of 10  $\text{ng}/\text{mL}$  and 10  $\text{pg}/\text{mL}$  after an exposure period of 4 hours and 24 hours, respectively, in the 2016-study; and at concentrations of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 100  $\text{pg}/\text{mL}$  after 4 hours and 24 hours of exposure, respectively, in the 2018-study. Moreover, they also tested different concentrations found in occupational settings, showing a significant decrease in viability at concentrations of the order of  $\text{ng}/\text{mL}$ , at both exposure times [331]. In other study published by the same authors, they evaluated 5-fluorouracil, etoposide and cisplatin, individually, at concentrations between 0.1 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and they observed a dose- and time-dependent cytotoxic activity [470]. Blasiak et al. (2000) [473] also evaluated the viability of human lymphocytes to different platinum compounds, showing no significant loss of viability at 10  $\mu\text{M}$  (30.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and even at a higher concentration (750  $\mu\text{M}$ , 225.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) approximately 80% of cells were viable. The results present in this chapter do not show a significant decrease in viability below 80% versus control cells after an exposure of 4 hours for any of the four compounds evaluated, and neither

for cyclophosphamide during one week of exposure using the MTS colorimetric assay.

Furthermore, several authors have assessed the genotoxic potential of different antineoplastic drugs on different cells or cell lines. Nevertheless, the evaluation of single compounds or mixtures of a few compounds is not a realistic situation, since at occupational settings workers are exposed to multiple compounds. Moreover, the presence of several antineoplastic drugs may have an additive or synergistic action, as stated by Gajski et al. (2016) [330], showing a higher genotoxic potential as compared to single compounds. For all of this, researchers from different countries have investigated the genotoxic damage in healthcare workers involved in preparation, administration or, generally, manipulation of antineoplastic drugs compared with control subjects not handling these drugs. Most of the publications evaluated the presence of biomarkers of genotoxicity in lymphocytes while few of them also assessed buccal cells [126; 132; 328]. Hospital pharmacists, pharmacy technicians and, mainly, nurses were the population most frequently monitored, although workers in manufacturing plants were also recruited in some studies [138; 324; 326].

Contradictory results have been observed in the comet assay studies in healthcare personnel. Some of them showed a statistically significant increase in DNA damage in exposed workers compared with controls [121; 122; 126; 128; 129; 133; 140-142; 321-327; 332; 382; 474], while others did not find significant differences between both groups [129; 132; 141; 328; 329]. Even when different parameters were evaluated using the same biomarker, as is the case of the comet assay (e.g.: tail length, tail moment, tail intensity, % DNA in comet tail), the results found in different published articles showed differences [129; 133; 324; 328]. Moreover, when different biomarkers were assessed simultaneously, such as DNA damage, micronuclei formation, chromosomal aberrations and/or sister chromatid exchanges, the results were not homogeneous among them, also showing contradictory results [120; 141; 324-326; 328]. Differences have even been observed when different cell types such as peripheral blood lymphocytes and buccal cells were assessed [120; 328]. Other articles that have assessed only cytogenetic biomarkers also showed conflicting results [120; 143].

The differences in the results obtained with the comet assay can be explained by several factors: 1) different methods for scoring, from visual to

automatic or semi-automatic scoring; and even within the same method, for example visual scoring, different scales has been applied [122; 128; 141; 142; 319; 322; 382]. However, a study conducted by Azqueta et al. (2011) [383], which assessed three scoring methods, shows that even though some differences were observed, the three approaches used can be regarded as reliable and interchangeable. 2) Different parameters evaluated: %DNA in comet tail, tail length, tail intensity and tail moment, and 3) different number of comets scored.

Other reasons such as study subjects, type and number of antineoplastic drugs handled, and confounding factors as gender, age, use of tobacco and duration of exposure should also be considered. Nevertheless, conflicting findings have also been detected in this regard. Some publications have found no correlation between DNA damage measure by the comet assay with age, sex and/or tobacco [133; 140; 322; 323; 327; 383], while others have shown positive correlations for one or several of these factors [126; 325; 382]. Two review articles published by Möller et al. (2000) [374] and Faust et al. (2004) [475] also showed discrepant results in DNA damage regarding age, gender, tobacco and alcohol consumption. The same situation occurs when length of exposure was evaluated, showing a positive correlation with DNA damage as the years of exposure increase [126; 325], in contrast to many other studies showing no correlations [128; 140; 141; 321-323; 327; 382]. These conflicting results could be explained partially by the interindividual variability in biotransformation processes and the differences in the repair mechanisms [118] and, on the other hand, by the limitations of the studies due to low statistical power [374].

The use of personal protective equipment (PPE) such as gloves, masks, coat or glasses, and collective measures, specific areas and appropriate cabinets for handling of antineoplastic drugs helps to reduce exposure and, consequently, the associated genotoxic effects. Several authors have assessed the relationship between the use of different PPE and the significant reduction of DNA damage measured by the comet assay. The results showed a statistically significant lower level of damage applying more than one type of measures [133; 140; 322; 323]. Moreover, when exposed subjects who did not take safety precautions were re-evaluated after implantation of protective equipment, damage levels were reduced to values

similar to those found in controls [321]. Despite that, genotoxicity is still detected even if protective measures were taken [122].

Overall, the assessment of genotoxicity biomarkers along with wipe sampling and biological monitoring are useful tools to evaluate the exposure and the possible risk it entails, from the presence of contamination in the work environment to the possible genetic damage caused to the organism, which would allow a better understanding of the sources of environmental contamination, the causes and routes of biological exposure, and the mechanisms of damage production.







## **BIBLIOGRAFÍA**



1. World Health Organization. (2018). Cancer. Key facts. Recuperado de <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
3. International Agency for Research on Cancer (IARC), WHO. (2018). Cancer today. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/home>
4. International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2018). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Press release 263.
5. Organization for Economic Cooperation and Development, (OECD). (2019). *Health at a glance 2019: OECD indicators* OECD Publishing. doi:<https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en> Recuperado de <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/4dd50c09-en>
6. (OECD) Organization for Economic Cooperation and Development. (2017). *Health at a glance 2017: OECD indicators* doi:[http://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2017-en](http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2017-en)
7. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. doi:10.3322/caac.21262
8. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International Journal of Cancer*, 94(2), 153-156. doi:10.1002/ijc.1440
9. Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.

*International Journal of Cancer*, 127(12), 2893-2917.  
doi:10.1002/ijc.25516

10. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210
11. Parkin, D. M., Pisani, P., & Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *International Journal of Cancer*, 80(6), 827-841. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990315)80:63.0.CO;2-P
12. International Agency for Research on Cancer (IARC), WHO. (2018). Cancer tomorrow. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>
13. Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., & Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *International Journal of Cancer*, 83(1), 18-29. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990924)83:13.0.CO;2-M
14. Sociedad Española de Oncología Médica, (SEOM). (2014). Las cifras del cáncer en España 2014.
15. Sociedad Española de Oncología Médica, (SEOM). (2017). Las cifras del cáncer en España 2017
16. Sociedad Española de Oncología Médica, (SEOM). (2018). Las cifras del cáncer en España 2018.
17. Sociedad Española de Oncología Médica, (SEOM). (2019). Las cifras del cáncer en España 2019.
18. Sociedad Española de Oncología Médica, (SEOM). (2020). Las cifras del cáncer en España 2020.
19. Instituto nacional de estadística (INE). Recuperado de [https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C](https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C)

[https://doi.org/10.1787/health\\_glance-2013-en](https://doi.org/10.1787/health_glance-2013-en)  
&cid=1254736176780&idp=1254735573175&menu=resultados#ltab-1254736194710

20. Lopez-Abente, G., Nuñez, O., Perez-Gomez, B., Aragonés, N., & Pollán, M. (2015). La situación del cáncer en España: Informe 2015 (The situation of cancer in Spain: Report 2015). Available at SSRN 2863882
21. Organization for Economic Cooperation and Development, (OECD). (2013). *Health at a glance 2013: OECD indicators* OECD Publishing. doi:[http://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2013-en](http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2013-en)
22. Wong, K. M., Hudson, T. J., & McPherson, J. D. (2011). Unraveling the genetics of cancer: Genome sequencing and beyond. *Annual Review of Genomics and Human Genetics, Vol 12, 12*, 407-430. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141532
23. Collins, A. R. (1998). Molecular epidemiology in cancer research. *Molecular aspects of medicine, 19*(6), 359-432. doi:[https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(99\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(99)00003-5)
24. Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). World cancer report 2014. Lyon, France
25. Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature, 458*(7239), 719-724. doi:10.1038/nature07943
26. World Health Organization. (2013). WHO report on the global tobacco epidemic, 2013: Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. World Health Organization.
27. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France.
28. de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: A worldwide

incidence analysis. doi:[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)

29. International Agency for Research on Cancer (IARC), WHO. (2018). Cancer causes. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/causes/infections/home>
30. Baker, G. L., Kahl, L. E., Zee, B. C., Stolzer, B. L., Agarwal, A. K., & Medsger, T. A. (1987). Malignancy following treatment of rheumatoid arthritis with cyclophosphamide: Long-term case-control follow-up study. doi:[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90490-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90490-6)
31. Curtis, R. E., Boice, J. D., Stovall, M., Bernstein, L., Greenberg, R. S., Flannery, J. T., . . . Hoover, R. N. (1992). Risk of leukemia after chemotherapy and radiation treatment for breast cancer. *N Engl J Med*, 326(26), 1745-1751. doi:10.1056/NEJM199206253262605
32. Greene, M. H., Harris, E. L., Gershenson, D. M., Malkasian Jr, G. D., Melton III, L. J., Dembo, A. J., . . . Boice Jr, J. D. (1986). Melphalan may be a more potent leukemogen than cyclophosphamide. *Annals of Internal Medicine*, 105(3), 360-367.
33. Haas, J. F., Kittelmann, B., Mehnert, W. H., Staneczek, W., Möhner, M., Kaldor, J. M., & Day, N. E. (1987). Risk of leukaemia in ovarian tumour and breast cancer patients following treatment by cyclophosphamide. *British Journal of Cancer*, 55(2), 213-218.
34. Kaldor, J. M., Day, N. E., Pettersson, F., Clarke, E. A., Pedersen, D., Mehnert, W., . . . Stovall, M. (1990). Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med*, 322(1), 1-6. doi:10.1056/NEJM199001043220101
35. Penn, I. (1976). Second malignant neoplasms associated with immunosuppressive medications. *Cancer*, 37(S2), 1024-1032.
36. Tucker, M. A., Coleman, C. N., Cox, R. S., Varghese, A., & Rosenberg, S. A. (1988). Risk of second cancers after treatment for hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine*, 318(2), 76-81.

37. Deniz, K., O'Mahony, S., Ross, G., & Purushotham, A. (2003). Breast cancer in women after treatment for hodgkin's disease. *The Lancet Oncology*, 4(4), 207-214.
38. Josting, A., Wiedenmann, S., Franklin, J., May, M., Sieber, M., Wolf, J., . . . Diehl, V. (2003). Secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients treated for hodgkin's disease: A report from the german hodgkin's lymphoma study group. *Journal of Clinical Oncology*, 21(18), 3440-3446.
39. Jiménez Torres, N. V., Albert Marí, A., Almenar Cubells, D., & Vandenbroucke, J. (2009). La seguridad del paciente oncológico. Estándares internacionales para el manejo de citotóxicos. Monografías De La Fundación José Casares Gil, (24)
40. Broto, M., Galve, R., & Marco, M. (2017). Bioanalytical methods for cytostatic therapeutic drug monitoring and occupational exposure assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93, 152-170. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.005>
41. Power, L. A. (1990). ASHP technical assistance bulletin on handling cytotoxic and hazardous drugs. *Am.J.Hosp.Pharm.*, 47(5), 1033-1049.
42. González-García, M. (2003). Protocolos de vigilancia sanitaria específica. Agentes citostáticos. *Comisión De Salud Pública. Consejo Interterritorial Del Sistema Nacional De Salud De España*, 92.
43. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, (INSHT). (2014). Preparación de fármacos antineoplásicos en los servicios de farmacia hospitalaria: Exposición a agentes citostáticos.
44. Guardino Solá, X., Rosell Farrás, M. G., & Galisteo Manzanares, M. (2006). NTP 740: Exposición laboral a citostáticos en el ámbito sanitario. *Instituto Nacional De Higiene Y Seguridad En El Trabajo. Ministerio De Trabajo Y Asuntos Sociales. Gobierno De España*.

45. Blasco, A., & Caballero, C. (2019). Toxicidad de los tratamientos oncológicos. Recuperado de <https://seom.org/guia-actualizada-de-tratamientos/toxicidad-de-los-tratamientos-oncologicos?showall=1>
46. Castro Núñez, I., Echarri Arrieta, E., Ferriols Lisart, F., García Silva, A., Martínez Cutillas, J., Oliveiras Arenas, M., & de Puig de Cabrera, Emilia. (2003). Medicamentos citostáticos. Guía de utilización (3ª Edición ed.) Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospitales (SEFH).
47. González Benedí, J., & Gómez del Río, María Angeles. (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*, 20(2), 60-64.
48. González Benedí, J., & Gómez del Río, María Angeles. (2006). Fármacos antineoplásicos (y II): Revisión. *Farmacia Profesional*, 20(3), 42-46.
49. Tessler, J., & Mirtas S. Varela, Diego Rosso. (2004). Farmacología II: Quimioterápicos, antineoplásicos e inmunosupresores. Recuperado de <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quimioterapicos-antineoplasicos-e-inmunosupresores.pdf>
50. Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology*, 17(5), 421-433. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012>
51. International Agency for Research on Cancer. (2019). IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. World Health Organization.
52. International Agency for Research on Cancer. (2020). Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-125. Recuperado de <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>
53. Connor, T. H., MacKenzie, B. A., DeBord, D. G., Trout, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2016). NIOSH list of antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings 2016. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National

Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH), Publication Number 2016-161.

54. Connor, T. H., & McDiarmid, M. A. (2006). Preventing occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 56(6), 354-365. doi:10.3322/canjclin.56.6.354
55. Burroughs, G. E., Connor, T. H., McDiarmid, M. A., Mead, K. R., Power, L. A., & Reed, L. D. (2004). NIOSH alert: Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings. Atlanta. DHHS (NIOSH) Publication, 1-50.
56. Delgado Sánchez, O., Guardino Solá, X., Moreno Centeno, E., Cercós Lleti, A. C., Alonso Herreros, J. M., Gaspar Carreño, M., & González-Haba Peña, E. (2016). Medicamentos peligrosos. Medidas de prevención para su preparación y administración. Instituto Nacional De Seguridad E Higiene En El Trabajo (INSHT). Ministerio De Empleo Y Seguridad Social. Gobierno De España, 83.
57. Chemical Hazards Emergency Medical Management, (CHEMM). U. S. Department of Health and Human Services. (2020). FDA pregnancy categories. Recuperado de <https://chemm.nlm.nih.gov/pregnancycategories.htm>
58. Pérez Landeiro, A., Allende-Bandrés, M. A., Agustín Fernández, M. J., & Palomo Palomo, P. (2002). Teratogénesis: Clasificaciones. *Farm Hosp*, 26(3), 171-177.
59. Figueroa R., Q. F. José A. (2012). Guía de clasificación teratogénica FDA. Santiago de Chile: INTERNATIONAL MEDICAL TEXTS.
60. Medicine use during pregnancy or breastfeeding. Recuperado de <https://www.drugs.com/pregnancy/>
61. Lal, R. (2015). Drugs in pregnancy and lactation: Improved benefit-risk information. FDA/CDER SBIA Chronicles.

62. Food and Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services. (2014). Pregnant? breastfeeding? Better drug information is coming. Recuperado de <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/pregnant-breastfeeding-better-drug-information-coming>
63. FDA pregnancy categories. FDA pregnancy risk information: An update. Recuperado de <https://www.drugs.com/pregnancy-categories.html#previous>
64. Food and Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services. (2020). Pregnancy and lactation labelling (drugs) final rule.
65. Content and format of labeling for human prescription drug and biological products; requirements for pregnancy and lactation labeling, Docket No. FDA-2006-N-0515U.S.C. (2014). Recuperado de <https://www.federalregister.gov/documents/2014/12/04/2014-28241/content-and-format-of-labeling-for-human-prescription-drug-and-biological-products-requirements-for>
66. Sessink, P. J. M., Sewell, G., Vandenbroucke, J., & Erce, A. Preventing occupational exposure to cytotoxic and other hazardous drugs. European policy recommendations. European Parliament.
67. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). Recuperado de <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
68. Erlichman, C., & Moore, M. (1996). Carcinogenesis: A late complication of cancer chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 45-58.
69. Alessio, L., Apostoli, P., Draicchio, F., Forni, A., Lucchini, R., Merler, E., . . . Sossai, D. (1997). Prevention of risks from occupational exposures to antineoplastic drugs: Consensus document. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 3(1), 84-87. doi:10.1179/oeh.1997.3.1.84

70. Power, L. A., & Coyne, J. W. (2018). ASHP guidelines on handling hazardous drugs. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 75(24), 1996-2031.
71. da Silva, Carla Brigagão Pacheco, Julio, I. P., Donadel, G. E., & Martins, I. (2016). UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of cyclophosphamide, docetaxel, doxorubicin and 5-fluorouracil in surface samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 82, 68-73. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.08.004>
72. Kiffmeyer, T. K., Tuerk, J., Hahn, M., Stuetzer, H., Hadtstein, C., Heinemann, A., & Eickmann, U. (2013). Application and assessment of a regular environmental monitoring of the antineoplastic drug contamination level in pharmacies-the MEWIP project. *Annals of Occupational Hygiene*, 57(4), 444-455.
73. Meijster, T., Fransman, W., Veldhof, R., & Kromhout, H. (2006). Exposure to antineoplastic drugs outside the hospital environment. *The Annals of Occupational Hygiene*, 50(7), 657-664.
74. Couch, J., Gibbins, J., & Connor, T. H. (2013). Case study: Evaluation of chemotherapy drug exposure at a veterinary teaching hospital in Michigan. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 10(4), D45-D51.
75. Graeve, C. U., McGovern, P. M., Alexander, B., Church, T., Ryan, A., & Polovich, M. (2017). Occupational exposure to antineoplastic agents: An analysis of health care workers and their environments. *Workplace Health & Safety*, 65(1), 9-20.
76. Polovich, M. (2016). Minimizing occupational exposure to antineoplastic agents. *Journal of Infusion Nursing*, 39(5), 307-313.
77. Moretti, M., Grollino, M. G., Pavanello, S., Bonfiglioli, R., Villarini, M., Appolloni, M., . . . Stronati, L. (2015). Micronuclei and chromosome aberrations in subjects occupationally exposed to antineoplastic drugs:

A multicentric approach. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 88(6), 683-695.

78. Connor, T. H., Sessink, P. J. M., Harrison, B. R., Pretty, J. R., Peters, B. G., Alfaro, R. M., . . . Anderson, L. M. (2005). Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: Results of three studies. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 62(5), 475-484.
79. Suspiro, A., & Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure to anticancer agents: A minireview. *Toxicology Letters*, 207(1), 42-52.
80. Sessink, P. J. M., Van De Kerkhof, Marc C. A., Anzion, R. B. M., Noordhoek, J., & Bos, R. P. (1994). Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: Is skin absorption an important exposure route? *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 49(3), 165-169.
81. Turci, R., Sottani, C., Schierl, R., & Minoia, C. (2006). Validation protocol and analytical quality in biological monitoring of occupational exposure to antineoplastic drugs. *Toxicology Letters*, 162(2-3), 256-262.
82. Turci, R., Sottani, C., Spagnoli, G., & Minoia, C. (2003). Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: A review of analytical methods. *Journal of Chromatography B*, 789(2), 169-209.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00100-4)
83. Falck, K., Gröhn, P., Sorsa, M., Vainio, H., Heinonen, E., & Holsti, L. R. (1979). Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet*, 1, 1250-1251.
84. Tortorici, M. P. (1980). Precautions followed by personnel involved with the preparation of parenteral antineoplastic medications. *Hospital Pharmacy*, 15(6), 293, 295-9.

85. Anderson, R. W., Puckett Jr, W. H., Dana, W. J., Nguyen, T. V., Theiss, J. C., & Matney, T. S. (1982). Risk of handling injectable antineoplastic agents. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 39(11), 1881-1887.
86. Nguyen, T. V., Theiss, J. C., & Matney, T. S. (1982). Exposure of pharmacy personnel to mutagenic antineoplastic drugs. *Cancer Research*, 42(11), 4792-4796.
87. Rogers, B., & Emmett, E. A. (1987). Handling antineoplastic agents: Urine mutagenicity in nurses. *IMAGE: The Journal of Nursing Scholarship*, 19(3), 108-113.
88. Siebert, D., & Simon, U. (1973). Cyclophosphamide: Pilot study of genetically active metabolites in the urine of a treated human patient induction of mitotic gene conversions in yeast. *Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 19(2), 65-72. doi:[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90114-0)
89. Krstev, S., Perunčić, B., & Vidaković, A. (2003). Work practice and some adverse health effects in nurses handling antineoplastic drugs. *La Medicina Del Lavoro*, 94(5), 432-439.
90. Valanis, B. G., Vollmer, W. M., Labuhn, K. T., & Glass, A. G. (1993). Association of antineoplastic drug handling with acute adverse effects in pharmacy personnel. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 50(3), 455-462.
91. Ivanova, K., & Avota, M. Antineoplastic drugs: Occupational exposure and side effects. Paper presented at the *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 70(5) 325-329.
92. Unsar, S., Kurt, S., Kostak, M. A., Yaman, R., & Özcan, M. (2016). Determination of antineoplastic drug exposure of nurses at a university hospital. *International Journal of Caring Sciences*, 9(1), 314.

93. ali Shahrasbi, A., Afshar, M., Shokraneh, F., Monji, F., Noroozi, M., Ebrahimi-Khojin, M., . . . Rajabi, M. (2014). Risks to health professionals from hazardous drugs in Iran: A pilot study of understanding of healthcare team to occupational exposure to cytotoxics. *EXCLI Journal*, 13, 491.
94. Baniasadi, S., Alehashem, M., Yunesian, M., & Rastkari, N. (2018). Biological monitoring of healthcare workers exposed to antineoplastic drugs: Urinary assessment of cyclophosphamide and ifosfamide. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 17(4), 1458.
95. Valanis, B. G., Vollmer, W. M., Labuhn, K. T., & Glass, A. G. (1993). Acute symptoms associated with antineoplastic drug handling among nurses. *Cancer Nursing*, 16(4), 288-295.
96. Kusnetz, E., & Condon, M. (2003). Acute effects from occupational exposure to antineoplastic drugs in a para-professional health care worker. *American Journal of Industrial Medicine*, 44(1), 107-109.
97. Walusiak, J., Wittczak, T., Ruta, U., & Palczynski, C. (2002). Occupational asthma due to mitoxantrone. *Allergy*, 57(5), 461.
98. McDiarmid, M., & Egan, T. (1988). Acute occupational exposure to antineoplastic agents. *Journal of Occupational Medicine. Official Publication of the Industrial Medical Association*, 30(12), 984-987.
99. Ladik, C. F., Stoehr, G. P., & Maurer, M. A. (1980). Precautionary measures in the preparation of antineoplastics. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 37(9), 1184-1186.
100. Constantinidis, T. C., Vagka, E., Dallidou, P., Basta, P., Drakopoulos, V., Kakolyris, S., & Chatzaki, E. (2011). Occupational health and safety of personnel handling chemotherapeutic agents in Greek hospitals. *European Journal of Cancer Care*, 20(1), 123-131.
101. Valanis, B., Vollmer, W., Labuhn, K., & Glass, A. (1997). Occupational exposure to antineoplastic agents and self-reported infertility among

- nurses and pharmacists. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 39(6), 574-580.
102. Martin, S. (2005). Chemotherapy handling and effects among nurses and their offspring. *Oncology Nursing Forum*, 32(2), 425-426.
103. Skov, T., Maarup, B., Olsen, J., Rørth, M., Winthereik, H., & Lynge, E. (1992). Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling antineoplastic drugs. *Occupational and Environmental Medicine*, 49(12), 855-861.
104. Ratner, P. A., Spinelli, J. J., Beking, K., Lorenzi, M., Chow, Y., Teschke, K., . . . Dimich-Ward, H. (2010). Cancer incidence and adverse pregnancy outcome in registered nurses potentially exposed to antineoplastic drugs. *BMC Nursing*, 9(1), 15.
105. Levin, L. I., Holly, E. A., & Seward, J. P. (1993). Bladder cancer in a 39 year-old female pharmacist. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 85(13), 1089-1091.
106. Sotaniemi, E. A., Sutinen, S., Arranto, A. J., Sutinen, S., Sotaniemi, K. A., Lehtola, J., & Pelkonen, R. O. (1983). Liver damage in nurses handling cytostatic agents. *Acta Medica Scandinavica*, 214(3), 181-189.
107. Stücker, I., Caillard, J., Collin, R., Gout, M., Poyen, D., & Hémon, D. (1990). Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 102-107.
108. Valanis, B., Vollmer, W. M., & Steele, P. (1999). Occupational exposure to antineoplastic agents: Self-reported miscarriages and stillbirths among nurses and pharmacists. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 41(8), 632-638.
109. Lawson, C. C., Rocheleau, C. M., Whelan, E. A., Hibert, E. N. L., Grajewski, B., Spiegelman, D., & Rich-Edwards, J. W. (2012). Occupational

- exposures among nurses and risk of spontaneous abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(4), 327 e1-327 e8.
110. Fransman, W., Roeleveld, N., Peelen, S., de Kort, W., Kromhout, H., & Heederik, D. (2007). Nurses with dermal exposure to antineoplastic drugs: Reproductive outcomes. *Epidemiology*, 112-119.
  111. Selevan, S. G., Lindbohm, M., Hornung, R. W., & Hemminki, K. (1985). A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. *New England Journal of Medicine*, 313(19), 1173-1178.
  112. Shirangi, A., Bower, C., Holman, C. J., Preen, D. B., & Bruce, N. (2014). A study of handling cytotoxic drugs and risk of birth defects in offspring of female veterinarians. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(6), 6216-6230.
  113. Hemminki, K., Kyrrönen, P., & Lindbohm, M. (1985). Spontaneous abortions and malformations in the offspring of nurses exposed to anaesthetic gases, cytostatic drugs, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 39(2), 141-147.
  114. Stücker, I., Mandereau, L., & Hémon, D. (1993). Relationship between birthweight and occupational exposure to cytostatic drugs during or before pregnancy. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, , 148-153.
  115. Bouraoui, S., Brahem, A., Tabka, F., Mrizek, N., Saad, A., & Elghezal, H. (2011). Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(1), 250-257.
  116. Mahmoodi, M., Soleyman-Jahi, S., Zendehtdel, K., Mozdarani, H., Azimi, C., Farzanfar, F., . . . Rezaei, N. (2017). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, and micronuclei in lymphocytes of oncology department personnel handling anti-neoplastic drugs. *Drug and*

117. Nikula, E., Kiviniitty, K., Leisti, J., & Taskinen, P. J. (1984). Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 71-74.
118. Goloni-Bertollo, E. M., Tajara, E. H., Manzato, A. J., & Varella-Garcia, M. (1992). Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. *International Journal of Cancer*, 50(3), 341-344.
119. Tompa, A., Jakab, M., Biro, A., Magyar, B., Fodor, Z., Klupp, T., & Major, J. (2006). Chemical safety and health conditions among Hungarian hospital nurses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076(1), 635-648.
120. Cavallo, D., Ursini, C. L., Perniconi, B., Di Francesco, A., Giglio, M., Rubino, F. M., . . . Iavicoli, S. (2005). Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 45-51.
121. Cornetta, T., Padua, L., Testa, A., Ievoli, E., Festa, F., Tranfo, G., . . . Cozzi, R. (2008). Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 638(1-2), 75-82.
122. Rombaldi, F., Cassini, C., Salvador, M., Saffi, J., & Erdtmann, B. (2009). Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis*, 24(2), 143-148.
123. Ursini, C. L., Salé, E. O., Fresegna, A. M., Ciervo, A., Jemos, C., Maiello, R., . . . Cavallo, D. (2019). Antineoplastic drug occupational exposure: A new integrated approach to evaluate exposure and early genotoxic and

cytotoxic effects by no-invasive buccal micronucleus cytome assay biomarker. *Toxicology Letters*, 316, 20-26.

124. Anwar, W. A. (1994). Assessment of cytogenetic changes in human populations at risk in Egypt. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 313(2-3), 183-191. doi:[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90048-5](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90048-5)
125. Ansari, L. M., Saadat, M., Shahriari, M., & Farhoud, D. D. (2001). Sister chromatid exchanges and micronuclei in lymphocyte of nurses handling antineoplastic drugs. *Iranian Journal of Public Health*, 30(1-2), 37-40.
126. Rekhadevi, P. V., Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Mahboob, M., Rahman, M. F., & Grover, P. (2007). Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. *Mutagenesis*, 22(6), 395-401.
127. Norppa, H., Sorsa, M., Vainio, H., Gröhn, P., Heinonen, E., Holsti, L., & Nordman, E. (1980). Increased sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 299-301.
128. Izdes, S., Sardas, S., Kadioglu, E., Kaymak, C., & Ozcagli, E. (2009). Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to anaesthetic gases or antineoplastic drugs by the comet assay. *Journal of Occupational Health*, 51(3), 283-286.
129. Sasaki, M., Dakeishi, M., Hoshi, S., Ishii, N., & Murata, K. (2008). Assessment of DNA damage in Japanese nurses handling antineoplastic drugs by the comet assay. *Journal of Occupational Health*, 50(1), 7-12.
130. McDiarmid, M. A., Oliver, M. S., Roth, T. S., Rogers, B., & Escalante, C. (2010). Chromosome 5 and 7 abnormalities in oncology personnel handling anticancer drugs. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 52(10), 1028-1034.
131. Ladeira, C., Viegas, S., Pádua, M., Carolino, E., Gomes, M. C., & Brito, M. (2015). Relation between DNA damage measured by comet assay and

OGG1 Ser326Cys polymorphism in antineoplastic drugs biomonitoring. *AIMS Genetics*, 2(3), 204-218.

132. Ursini, C. L., Cavallo, D., Colombi, A., Giglio, M., Marinaccio, A., & Iavicoli, S. (2006). Evaluation of early DNA damage in healthcare workers handling antineoplastic drugs. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(2), 134.
133. Villarini, M., Dominici, L., Piccinini, R., Fatigoni, C., Ambrogi, M., Curti, G., . . . Moretti, M. (2011). Assessment of primary, oxidative and excision repaired DNA damage in hospital personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis*, 26(3), 359-369.
134. Hessel, H., Radon, K., Pethran, A., Maisch, B., Gröbmair, S., Sautter, I., & Fruhmann, G. (2001). The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs - evaluation by the micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497(1-2), 101-109.
135. Barale, R., Sozzi, G., Toniolo, P., Borghi, O., Reali, D., Loprieno, N., & Della Porta, G. (1985). Sister-chromatid exchanges in lymphocytes and mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 157(2-3), 235-240.
136. Kolmodin-Hedman, B., Hartvig, P., Sorsa, M., & Falck, K. (1983). Occupational handling of cytostatic drugs. *Archives of Toxicology*, 54(1), 25-33.
137. Roth, S., Norppa, H., Järventaus, H., Kyyrönen, P., Ahonen, M., Lehtomäki, J., . . . Sorsa, M. (1994). Analysis of chromosomal aberrations, sister-chromatic exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutation Research Letters*, 325(4), 157-162.
138. Sorsa, M., Pyy, L., Salomaa, S., Nylund, L., & Yager, J. W. (1988). Biological and environmental monitoring of occupational exposure to

- cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutation Research*, 204(3), 465-479.
139. Krepinsky, A., Bryant, D. W., Davison, L., Young, B., Heddle, J., McCalla, D. R., . . . Michalko, K. (1990). Comparison of three assays for genetic effects of antineoplastic drugs on cancer patients and their nurses. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 15(2), 83-92.
  140. Kopjar, N., Garaj-Vrhovac, V., Kasuba, V., Rozgaj, R., Ramic, S., Pavlica, V., & Zeljezic, D. (2009). Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: A multi-biomarker approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(4), 414-431.
  141. Maluf, S. W., & Erdtmann, B. (2000). Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 471(1-2), 21-27.
  142. Mader, R. M., Kokalj, A., Kratochvil, E., Pilger, A., & Rüdiger, H. W. (2009). Longitudinal biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Journal of Clinical Nursing*, 18(2), 263-269.
  143. Kasuba, V., Rozgaj, R., & Garaj-Vrhovac, V. Analysis of sister chromatid exchange and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. Paper presented at the *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications*, 19(6) 401-404.
  144. Oestreicher, U., Stephan, G., & Glatzel, M. (1990). Chromosome and SCE analysis in peripheral lymphocytes of persons occupationally exposed to cytostatic drugs handled with and without use of safety covers. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 242(4), 271-277.

145. American Society of Health-System Pharmacists, (ASHP). (1985). ASHP technical assistance bulletin on handling cytotoxic drugs in hospitals. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 42, 131-137.
146. National Institutes of Health (NIH), U. S. Department of Health and Human Services. (1983). Recommendations for the safe handling of parenteral antineoplastic drugs. *NIH Publication N° 83-2621*. Bethesda, MD: Division of Safety, National Institutes of Health,
147. Occupational Safety and Health Administration (OSHA), U. S. Department of Labor. (1986). Work practice guidelines for personnel dealing with cytotoxic (antineoplastic) drugs. *OSHA Publication 8-1.1*. Washington DC: Occupational Safety and Health Administration.
148. Oncology Nursing Society Education Committee. (1982). Outcome standards for cancer nursing education. Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society:
149. American Medical Association's Council on Scientific Affairs. (1985). Guidelines for handling parenteral antineoplastics. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 253(11), 1590-1592. doi:10.1001/jama.1985.03350350084026.
150. Canadian Society of Hospital Pharmacists. (1981). *Guidelines for the handling of hazardous pharmaceuticals*. Toronto, Canada.
151. Kastango, E. S., & Bradshaw, B. D. (2004). USP chapter 797: Establishing a practice standard for compounding sterile preparations in pharmacy. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 61(18).
152. Pharmacopeia, U. S. (2019). USP general chapter < 800 > hazardous drugs - handling in healthcare settings. *USP 40 NF - 35, Second Supplement (2017)*.
153. Comisión Europea. (1989). DIRECTIVA DEL CONSEJO de 12 de junio de 1989 relativa a la aplicación de medidas para promover la mejora de la seguridad y de la salud de los trabajadores en el trabajo (89/391/CEE)

- (versión consolidada). *Diario Oficial De La Unión Europea*, 183, 1-15. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:01989L0391-20081211>
154. Parlamento Europeo, & Consejo de la Unión Europea. (1998). Directiva 98/24/CE del consejo de 7 de abril de 1998 relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (decimocuarta directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la directiva 89/391/CEE). *Diario Oficial De La Unión Europea*. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex:31998L0024>
155. Parlamento Europeo, & Consejo de la Unión Europea. (2004). Directiva 2004/48/CE del parlamento europeo y del consejo de 29 de abril de 2004 relativa a la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes carcinógenos o mutágenos durante el trabajo (sexta directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la directiva 89/391/CEE del consejo). Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32004L0048>
156. Internation Programme on Chemical Safety. World Health Organization. (2014). Environmental health criteria 242. Dermal exposure.
157. International Society of Oncology Pharmacy Practicioners Standards Committee. (2007). ISOPP standards of practice. Safe handling of cytotoxics. *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 13 supl 1, 1-81. doi:<https://doi.org/10.1177/1078155207082350>
158. Guardino Solá, X., & Rosell Farrás, M. G. (1986). NTP 163: Exposición laboral a compuestos citostáticos. *Instituto Nacional De Seguridad E Higiene En El Trabajo (INSHT)*. *Minsterio De Trabajo Y Asuntos Sociales. Gobierno De España*.

159. Hernández, A., & Luna Mendaza, P. (1989). Cabinas de seguridad biológica. *Instituto Nacional De Higiene Y Seguridad En El Trabajo (INSHT). Ministerio De Trabajo Y Asuntos Sociales. Gobierno De España.*
160. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (2018). NTP 1134. Exposición laboral a medicamentos peligrosos: Sistemas seguros para su preparación. *Instituto Nacional De Seguridad Y Salud En El Trabajo (INSST). Ministerio De Trabajo, Migraciones Y Seguridad Social. Gobierno De España.* Recuperado de <https://www.insst.es/ntp-notas-tecnicas-de-prevencion>
161. González-Haba Peña, E., Gaspar Carreño, M., & Guardino Solá, X. (2018). NTP 1135. Medicamentos peligrosos: Administración y equipos disponibles. *Instituto Nacional De Seguridad Y Salud En El Trabajo (INSST). Ministerio De Trabajo, Migraciones Y Seguridad Social. Gobierno De España.*
162. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitario, (AEMPS). (2005). Real farmacopea española 3ª edición. Madrid.
163. Arce Valladares, J., Arenaza Peña, A., Barrueco Fernández, N., Cabrerizo Escribano, E., Colás Jiménez, V., Díez Viñas, V., . . . Valle Robles, M. (2014). Guía de buenas prácticas para trabajadores profesionalmente expuestos a agentes citostáticos. *Escuela Nacional De Medicina Del Trabajo. Instituto De Salud Carlos III. Ministerio De Economía Y Competitividad, Madrid.*
164. Parlamento Europeo, & Consejo de la Unión Europea. (2017). Directiva (UE) 2017/2398 del parlamento europeo y del consejo de 12 de diciembre de 2017 por la que se modifica la directiva 2004/37/CE. *Diario Oficial De La Unión Europea.* Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1593977277840&uri=CELEX:32017L2398>.
165. Parlamento Europeo, & Consejo de la Unión Europea. (2019). Directiva (UE) 2019/1831 de la comisión de 24 de octubre de 2019 por la que se establece una quinta lista de valores límite de exposición profesional

indicativos de conformidad con la directiva 98/24/CE del consejo. *Diario Oficial De La Unión Europea*. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32019L1831>.

166. Bos, P. M., Brouwer, D. H., Stevenson, H., Boogaard, P. J., de Kort, W L A M, & Van Hemmen, J. J. (1998). Proposal for the assessment of quantitative dermal exposure limits in occupational environments: Part 1. Development of a concept to derive a quantitative dermal occupational exposure limit. *Occupational and Environmental Medicine*, 55(12), 795-804. doi:10.1136/oem.55.12.795.
167. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits, (SCOEL). (2014). List of recommended health-based biological limit values (BLVs) and biological guidance values (BGVs).
168. Comisión Europea. Empleo, Asuntos Sociales e Inclusión. (2011). SCOEL recommendations (list).
169. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, (INSST). (2019). Límites de exposición profesional para agentes químicos en España. 2019.
170. Ministerio de la Presidencia, Gobierno de España. (1997). Real decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. *Boletín Oficial Del Estado*. Referencia: BOE-A-1997-11145.
171. Ministerio de la Presidencia. Gobierno de España. (2001). 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 De Estado*. Referencia: BOE-A-2001-8436.
172. Parlamento Europeo, Consejo de la Unión Europea. (2008). Reglamento (CE) no. 1272/2008 del parlamento europeo y del consejo, de 16 de

diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. *Diario Oficial De La Unión Europea*.

173. Ministerio de la Presidencia. Gobierno de España. (1995). Real decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. *Boletín Oficial Del Estado*. Referencia: BOE-A-1995-13535.
174. Poupeau, C., Tanguay, C., Caron, N. J., & Bussières, J. (2016). Multicenter study of environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate in 48 Canadian hospitals. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 24(1), 9-17. doi:<https://doi.org/10.1177/1078155216676632>
175. Connor, T. H., Zock, M. D., & Snow, A. H. (2016). Surface wipe sampling for antineoplastic (chemotherapy) and other hazardous drug residue in healthcare settings: Methodology and recommendations. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 13(9), 658-667. doi:<https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1165912>
176. Crul, M., & Simons-Sanders, K. (2017). Carry-over of antineoplastic drug contamination in Dutch hospital pharmacies. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 24(7), 483-489. doi:<https://doi.org/10.1177/1078155217704990>
177. Dugheri, S., Bonari, A., Pompilio, I., Boccalon, P., Mucci, N., & Arcangeli, G. (2018). A new approach to assessing occupational exposure to antineoplastic drugs in hospital environments. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(3), 226-237. doi:<https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3125>
178. Sottani, C., Porro, B., Comelli, M., Imbriani, M., & Minoia, C. (2010). An analysis to study trends in occupational exposure to antineoplastic drugs among health care workers. *Journal of Chromatography B*, 878(27), 2593-2605.

179. Roadmap on carcinogens. (2019). The facts occupational exposure to carcinogens. Recuperado de <https://roadmaponcarcinogens.eu/>
180. Chauchat, L., Tanguay, C., Caron, N. J., Gagné, S., Labrèche, F., & Bussi eres, J. F. (2019). Surface contamination with ten antineoplastic drugs in 83 Canadian centers. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 25(5), 1089-1098. doi:<https://doi.org/10.1177/1078155218773862>
181. International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization. (1993). *Environmental health criteria 155. Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles*.
182. Arango, S. S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional De Salud Pública*, 30(1), 75-82.
183. Gil Hernández, F. (2000). El papel de los biomarcadores en toxicología humana. *Departamento De Medicina Legal, Facultad De Medicina De La Universidad De Granada*.
184. Altamirano, M., Delgado, V., & Huelva, S. F. (2020). Cabello humano para valorar la exposición a arsénico en usuarios de agua contaminada de la comunidad La Fuente en La Paz centro, León. *Revista Torreón Universitario*, 9(25), 94-109.
185. Appenzeller, B. M., & Tsatsakis, A. M. (2012). Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: State of the art, critical review and future needs. *Toxicology Letters*, 210(2), 119-140.
186. Niculescu, T., Dumitru, R., Botha, V., Alexandrescu, R., & Manolescu, N. (1983). Relationship between the lead concentration in hair and occupational exposure. *Occupational and Environmental Medicine*, 40(1), 67-70.
187. Ramakrishna, V., Singh, V., & Garg, A. N. (1996). Occupational exposure amongst locomotive shed workers and welders using neutron activation analysis of scalp hair. *Science of the Total Environment*, 192(3), 259-267.

188. D'ilio, S., Violante, N., Senofonte, O., & Caroli, S. (2000). Occupational exposure of goldsmith workers of the area of Rome to potentially toxic metals as monitored through hair analysis. *Microchemical Journal*, 67(1-3), 343-349.
189. Zhang, H., Wang, P., Li, Y., Shang, H., Wang, Y., Wang, T., . . . Jiang, G. (2013). Assessment on the occupational exposure of manufacturing workers to dechlorane plus through blood and hair analysis. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10567-10573.
190. Hirst, M., Mills, D., Tse, S., Levin, L., & White, D. (1984). Occupational exposure to cyclophosphamide. *The Lancet*, 323(8370), 186-188.
191. Evelo, C., Bos, R. P., Peters, J., & Henderson, P. T. (1986). Urinary cyclophosphamide assay as a method for biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 58(2), 151-155.
192. Sessink, P. J., Anzion, R. B., Van den Broek, Petra HH, & Bos, R. P. (1992). Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department. *Pharmaceutisch Weekblad*, 14(1), 16-22.
193. Sessink, P., Boer, K. A., Scheefhals, A., Anzion, R., & Bos, R. P. (1992). Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 64(2), 105-112.
194. Ensslin, A. S., Stoll, Y., Pethran, A., Pfaller, A., Römmelt, H., & Fruhmann, G. (1994). Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Occupational and Environmental Medicine*, 51(4), 229-233.
195. Sessink, P., Friemel, N., Anzion, R., & Bos, R. P. (1994). Biological and environmental monitoring of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to methotrexate. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 65(6), 401-403.

196. Mader, R. M., Rizovski, B., Steger, G. G., Wachter, A., Kotz, R., & Rainer, H. (1996). Exposure of oncologic nurses to methotrexate in the treatment of osteosarcoma. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 51(4), 310-314.
197. Ensslin, A. S., Huber, R., Pethran, A., Römmelt, H., Schierl, R., Kulka, U., & Fruhmann, G. (1997). Biological monitoring of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs: Urinary excretion and cytogenetics studies. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 70(3), 205-208.
198. Minoia, C., Turci, R., Sottani, C., Schiavi, A., Perbellini, L., Angeleri, S., . . . Apostoli, P. (1998). Application of high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the environmental and biological monitoring of health care personnel occupationally exposed to cyclophosphamide and ifosfamide. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(20), 1485-1493.
199. Sottani, C., Turci, R., Perbellini, L., & Minoia, C. (1998). Liquid-liquid extraction procedure for trace determination of cyclophosphamide in human urine by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(16), 1063-1068.
200. Turci, R., Sottani, C., Ronchi, A., & Minoia, C. (2002). Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicology Letters*, 134(1-3), 57-64.
201. Ziegler, E., Mason, H. J., & Baxter, P. J. (2002). Occupational exposure to cytotoxic drugs in two UK oncology wards. *Occupational and Environmental Medicine*, 59(9), 608-612.
202. Pethran, A., Schierl, R., Hauff, K., Grimm, C., Boos, K., & Nowak, D. (2003). Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: Monitoring of urinary concentrations. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76(1), 5-10.

203. Wick, C., Slawson, M. H., Jorgenson, J. A., & Tyler, L. S. (2003). Using a closed-system protective device to reduce personnel exposure to antineoplastic agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 60(22), 2314-2320.
204. Barbieri, A., Nucci, M. C., Sabatini, L., Risi, A., Bolognesi, C., Colacci, A., & Violante, F. S. (2005). Occupational exposure to antineoplastic drugs in a hospital setting: Biological and environmental monitoring. *Epidemiologia E Prevenzione*, 29(5-6 Suppl), 87-90.
205. Mason, H. J., Blair, S., Sams, C., Jones, K., Garfitt, S. J., Cuschieri, M. J., & Baxter, P. J. (2005). Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 603-610.
206. Barbieri, A., Sabatini, L., Indiveri, P., Bonfiglioli, R., Lodi, V., & Violante, F. S. (2006). Simultaneous determination of low levels of methotrexate and cyclophosphamide in human urine by micro liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 20(12), 1889-1893.
207. Fransman, W., Peelen, S., Hilhorst, S., Roeleveld, N., Heederik, D., & Kromhout, H. (2007). A pooled analysis to study trends in exposure to antineoplastic drugs among nurses. *The Annals of Occupational Hygiene*, 51(3), 231-239.
208. Ikeda, K., Yagi, Y., Takegami, M., Lu, Y., Morimoto, K., & Kurokawa, N. (2007). Efforts to ensure safety of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to antineoplastic drugs during a preparation task. *Hospital Pharmacy*, 42(3), 209-218.
209. Nyman, H. A., Jorgenson, J. A., & Slawson, M. H. (2007). Workplace contamination with antineoplastic agents in a new cancer hospital using a closed-system drug transfer device. *Hospital Pharmacy*, 42(3), 219-225.

210. Hedmer, M., Tinnerberg, H., Axmon, A., & Jönsson, B. (2008). Environmental and biological monitoring of antineoplastic drugs in four workplaces in a Swedish hospital. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 81(7), 899-911.
211. Sottani, C., Rinaldi, P., Leoni, E., Poggi, G., Teragni, C., Delmonte, A., & Minoia, C. (2008). Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: Bioanalytical method validation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 22(17), 2645-2659.
212. Connor, T. H., DeBord, D. G., Pretty, J. R., Oliver, M. S., Roth, T. S., Lees, P. S., . . . Toennis, C. A. (2010). Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 52(10), 1019-1027.
213. Maeda, S., Miyawaki, K., Matsumoto, S., Oishi, M., Miwa, Y., & Kurokawa, N. (2010). Evaluation of environmental contaminations and occupational exposures involved in preparation of chemotherapeutic drugs. *Yakugaku Zasshi*, 130(6), 903-910.
214. Pieri, M., Castiglia, L., Basilicata, P., Sannolo, N., Acampora, A., & Miraglia, N. (2010). Biological monitoring of nurses exposed to doxorubicin and epirubicin by a validated liquid chromatography/fluorescence detection method. *Annals of Occupational Hygiene*, 54(4), 368-376.
215. Hama, K., Fukushima, K., Hirabatake, M., Hashida, T., & Kataoka, K. (2012). Verification of surface contamination of Japanese cyclophosphamide vials and an example of exposure by handling. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 18(2), 201-206.

216. Moretti, M., Bonfiglioli, R., Feretti, D., Pavanello, S., Mussi, F., Grollino, M. G., . . . Carrieri, M. (2011). A study protocol for the evaluation of occupational mutagenic/carcinogenic risks in subjects exposed to antineoplastic drugs: A multicentric project. *BMC Public Health, 11*(1), 1-10.
217. Sugiura, S., Nakanishi, H., Asano, M., Hashida, T., Tanimura, M., Hama, T., & Nabeshima, T. (2011). Multicenter study for environmental and biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in Japan. *Journal of Oncology Pharmacy Practice, 17*(1), 20-28.
218. Sugiura, S., Asano, M., Kinoshita, K., Tanimura, M., & Nabeshima, T. (2011). Risks to health professionals from hazardous drugs in japan: A pilot study of environmental and biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *Journal of Oncology Pharmacy Practice, 17*(1), 14-19.
219. Turci, R., Minoia, C., Sottani, C., Coghi, R., Severi, P., Castriotta, C., . . . Imbriani, M. (2011). Occupational exposure to antineoplastic drugs in seven Italian hospitals: The effect of quality assurance and adherence to guidelines. *Journal of Oncology Pharmacy Practice, 17*(4), 320-332.
220. Yoshida, J., Koda, S., Nishida, S., Yoshida, T., Miyajima, K., & Kumagai, S. (2011). Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. *Journal of Oncology Pharmacy Practice, 17*(1), 29-38.
221. Sottani, C., Porro, B., Imbriani, M., & Minoia, C. (2012). Occupational exposure to antineoplastic drugs in four Italian health care settings. *Toxicology Letters, 213*(1), 107-115.
222. Miyake, T., Iwamoto, T., Tanimura, M., & Okuda, M. (2013). Impact of closed-system drug transfer device on exposure of environment and healthcare provider to cyclophosphamide in Japanese hospital. *Springerplus, 2*(1), 273.

223. Rosales-Rimache, J. A. (2013). Evaluación de la exposición ocupacional a ciclofosfamida en nueve hospitales del Perú. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 30, 590-594.
224. Yoshida, J., Koda, S., Nishida, S., Nakano, H., Tei, G., & Kumagai, S. (2013). Association between occupational exposure and control measures for antineoplastic drugs in a pharmacy of a hospital. *Annals of Occupational Hygiene*, 57(2), 251-260.
225. Ramphal, R., Bains, T., Vaillancourt, R., Osmond, M. H., & Barrowman, N. (2014). Occupational exposure to cyclophosphamide in nurses at a single center. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 56(3), 304-312.
226. Hon, C., Teschke, K., Shen, H., Demers, P. A., & Venner, S. (2015). Antineoplastic drug contamination in the urine of Canadian healthcare workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 88(7), 933-941.
227. Villarini, M., Gianfredi, V., Levorato, S., Vannini, S., Salvatori, T., & Moretti, M. (2016). Occupational exposure to cytostatic/antineoplastic drugs and cytogenetic damage measured using the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 35-45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.05.001>
228. Sessink, P. J., Leclercq, G. M., Wouters, D., Halbardier, L., Hammad, C., & Kassoul, N. (2015). Environmental contamination, product contamination and workers exposure using a robotic system for antineoplastic drug preparation. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 21(2), 118-127.
229. Fabrizi, G., Fioretti, M., & Mainero Rocca, L. (2016). Dispersive solid-phase extraction procedure coupled to UPLC-ESI-MS/MS analysis for the simultaneous determination of thirteen cytotoxic drugs in human urine. *Biomedical Chromatography*, 30(8), 1297-1308.

230. Poupeau, C., Tanguay, C., Plante, C., Gagné, S., Caron, N., & Bussi eres, J. (2017). Pilot study of biological monitoring of four antineoplastic drugs among Canadian healthcare workers. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 23(5), 323-332.
231. Canal-Raffin, M., Khennoufa, K., Martinez, B., Goujon, Y., Folch, C., Ducint, D., . . . Molimard, M. (2016). Highly sensitive LC–MS/MS methods for urinary biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate antineoplastic drugs and routine application. *Journal of Chromatography B*, 1038, 109-117.
232. Dugheri, S., Bonari, A., Pompilio, I., Boccalon, P., Tognoni, D., Cecchi, M., . . . Arcangeli, G. (2018). Analytical strategies for assessing occupational exposure to antineoplastic drugs in healthcare workplaces. *Medycyna Pracy*, 69(6), 589-603.
233. Izzo, V., Charlier, B., Bloise, E., Pingeon, M., Romano, M., Finelli, A., . . . Alfieri, M. (2018). A UHPLC–MS/MS-based method for the simultaneous monitoring of eight antitubercular drugs in plasma and urine of exposed healthcare workers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 245-251.
234. Koller, M., Böhlandt, A., Haberl, C., Nowak, D., & Schierl, R. (2018). Environmental and biological monitoring on an oncology ward during a complete working week. *Toxicology Letters*, 298, 158-163.
235. Chauchat, L., Tanguay, C., Therrien, R., Dufour, A., Gagné, S., Caron, N. J., & Bussi eres, J. (2019). Biological monitoring of 4 antineoplastic drugs in health care workers from 2 adult hospitals: A pilot study. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 72(1), 56.
236. Acampora, A., Castiglia, L., Miraglia, N., Pieri, M., Soave, C., Liotti, F., & Sannolo, N. (2005). A case study: Surface contamination of cyclophosphamide due to working practices and cleaning procedures in two Italian hospitals. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 611-618.

237. Sabatini, L., Barbieri, A., Tosi, M., & Violante, F. S. (2005). A new high-performance liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(5), 669-674.
238. Schierl, R., Böhländt, A., & Nowak, D. (2009). Guidance values for surface monitoring of antineoplastic drugs in German pharmacies. *Annals of Occupational Hygiene*, 53(7), 703-711.
239. Siderov, J., Kirsa, S., & McLauchlan, R. (2009). Surface contamination of cytotoxic chemotherapy preparation areas in Australian hospital pharmacy departments. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 39(2), 117-121.
240. Touzin, K., Bussieres, J., Langlois, É, & Lefebvre, M. (2009). Evaluation of surface contamination in a hospital hematology—oncology pharmacy. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 15(1), 53-61.
241. Chu, W. C., Hon, C., Danyluk, Q., Chua, P. P., & Astrakianakis, G. (2012). Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre-and post-cleaning. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 18(1), 46-51.
242. Hon, C., Teschke, K., Chua, P., Venners, S., & Nakashima, L. (2011). Occupational exposure to antineoplastic drugs: Identification of job categories potentially exposed throughout the hospital medication system. *Safety and Health at Work*, 2(3), 273-281.
243. Kopp, B., Crauste-Manciet, S., Guibert, A., Mourier, W., Guerrault-Moro, M., Ferrari, S., . . . Schierl, R. (2013). Environmental and biological monitoring of platinum-containing drugs in two hospital pharmacies using positive air pressure isolators. *Annals of Occupational Hygiene*, 57(3), 374-383.

244. Maeda, S., & Miwa, Y. (2013). Multicomponent high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of ten chemotherapeutic drugs in wipe samples. *Journal of Chromatography B*, 921, 43-48.
245. Viegas, S., Pádua, M., Veiga, A. C., Carolino, E., & Gomes, M. (2014). Antineoplastic drugs contamination of workplace surfaces in two Portuguese hospitals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(11), 7807-7818.
246. Odraska, P., Dolezalova, L., Kuta, J., Oravec, M., Piler, P., Synek, S., & Blaha, L. (2014). Association of surface contamination by antineoplastic drugs with different working conditions in hospital pharmacies. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 69(3), 148-158.
247. Ramphal, R., Bains, T., Goulet, G., & Vaillancourt, R. (2015). Occupational exposure to chemotherapy of pharmacy personnel at a single centre. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 68(2), 104.
248. Enciso-Zarate, A., Guzmán-Oviedo, J., Sánchez-Cardona, F., Martínez-Rohenes, D., Rodríguez-Palomino, J. C., Alvarez-Risco, A., . . . Diaz-Risco, S. (2016). Evaluación de la contaminación con agentes citotóxicos en hospitales en Colombia. *Pharmaceutical Care España*, 18(6), 241-250.
249. Merger, D., Tanguay, C., Langlois, E., Lefebvre, M., & Bussièrès, J. (2014). Multicenter study of environmental contamination with antineoplastic drugs in 33 Canadian hospitals. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 87(3), 307-313.
250. Berruyer, M., Tanguay, C., Caron, N. J., Lefebvre, M., & Bussièrès, J. F. (2015). Multicenter study of environmental contamination with antineoplastic drugs in 36 Canadian hospitals: A 2013 follow-up study. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 12(2), 87-94.
251. Roland, C., Caron, N., & Bussièrès, J. F. (2017). Multicenter study of environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and

- methotrexate in 66 Canadian hospitals: A 2016 follow-up study. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(8), 650-658.
252. Hilliquin, D., Tanguay, C., Gagné, S., Carin, N., & Bussi eres, J. F. (2019). Multicenter study of environmental contamination with ten antineoplastic drugs in 79 Canadian centers: A 2018 follow-up study. *Can J Hosp Pharm*, 72, 79.
253. Bussi eres, J., Tanguay, C., Touzin, K., Langlois,  , & Lefebvre, M. (2012). Environmental contamination with hazardous drugs in Quebec hospitals. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 65(6), 428.
254. Bobin-Dubigeon, C., Amiand, M., Percheron, C., Audeval, C., Rochard, S., Leynia, P., & Bard, J. (2013). A new, validated wipe-sampling procedure coupled to LC–MS analysis for the simultaneous determination of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide in surface contamination. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 433-439.
255. Hon, C., Teschke, K., Chu, W., Demers, P., & Venners, S. (2013). Antineoplastic drug contamination of surfaces throughout the hospital medication system in Canadian hospitals. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 10(7), 374-383.
256. Dal Bello, F., Santoro, V., Scarpino, V., Martano, C., Aigotti, R., Chiappa, A., . . . Medana, C. (2016). Antineoplastic drugs determination by HPLC-HRMSn to monitor occupational exposure. *Drug Testing and Analysis*, 8(7), 730-737.
257. Sottani, C., Grignani, E., Oddone, E., Dezza, B., Negri, S., Villani, S., & Cottica, D. (2017). Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs in Italian hospitals: Performance-based hygienic guidance values (HGVs) project. *Annals of Work Exposures and Health*, 61(8), 994-1002.
258. Crauste-Manciet, S., Sessink, P., Ferrari, S., Jomier, J., & Brossard, D. (2005). Environmental contamination with cytotoxic drugs in healthcare using positive air pressure isolators. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 619-628.

259. Favier, B., Gilles, L., Ardiet, C., & Latour, J. F. (2003). External contamination of vials containing cytotoxic agents supplied by pharmaceutical manufacturers. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 9(1), 15-20.
260. Mason, H. J., Morton, J., Garfitt, S. J., Iqbal, S., & Jones, K. (2003). Cytotoxic drug contamination on the outside of vials delivered to a hospital pharmacy. *Annals of Occupational Hygiene*, 47(8), 681-685.
261. Hedmer, M., Georgiadi, A., Bremberg, E. R., Jönsson, B., & Eksborg, S. (2005). Surface contamination of cyclophosphamide packaging and surface contamination with antineoplastic drugs in a hospital pharmacy in Sweden. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 629-637.
262. Alcântara, Adélia Maria Pimenta de Pádua, Vitor, R. V., Vieira, E. P., & Martins, I. (2010). Simultaneous detection of three antineoplastic drugs on gloves by liquid chromatography with diode array detector. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(4), 731-740.
263. Schierl, R., Herwig, A., Pfaller, A., Groebmair, S., & Fischer, E. (2010). Surface contamination of antineoplastic drug vials: Comparison of unprotected and protected vials. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 428-429.
264. Janes, A., Tanguay, C., Caron, N. J., & Bussi eres, J. (2015). Environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate: A study of 51 Canadian centres. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 68(4), 279.
265. Guichard, N., Rudaz, S., Bonnabry, P., & Fleury-Souverain, S. (2019). Validation and uncertainty estimation for trace amounts determination of 25 drugs used in hospital chemotherapy compounding units. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 172, 139-148.
266. Kopp, B., Schierl, R., & Nowak, D. (2013). Evaluation of working practices and surface contamination with antineoplastic drugs in outpatient

- oncology health care settings. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 86(1), 47-55.
267. Fransman, W., Huizer, D., Tuerk, J., & Kromhout, H. (2007). Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(5), 396-403.
268. Simon, N., Vasseur, M., Pinturaud, M., Soichot, M., Richeval, C., Humbert, L., . . . Bonnabry, P. (2016). Effectiveness of a closed-system transfer device in reducing surface contamination in a new antineoplastic drug-compounding unit: A prospective, controlled, parallel study. *PloS One*, 11(7), e0159052.
269. Fransman, W., Vermeulen, R., & Kromhout, H. (2004). Occupational dermal exposure to cyclophosphamide in Dutch hospitals: A pilot study. *Annals of Occupational Hygiene*, 48(3), 237-244.
270. Hon, C., Teschke, K., Demers, P. A., & Venners, S. (2014). Antineoplastic drug contamination on the hands of employees working throughout the hospital medication system. *Annals of Occupational Hygiene*, 58(6), 761-770.
271. Azari, M., Panahi, D., Akbari, M. E., Mirzaei, H. R., Rezvani, H. R., Zendehtel, R., . . . Bayatian, M. (2017). Environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide drug in two Iranian hospitals. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 10(1)
272. Fransman, W., Vermeulen, R., & Kromhout, H. (2005). Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 78(5), 403-412.
273. Hon, C., Astrakianakis, G., Danyluk, Q., & Chu, W. (2011). Pilot evaluation of dermal contamination by antineoplastic drugs among hospital pharmacy personnel. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 64(5), 327.

274. Hedmer, M., Jönsson, B. A., & Nygren, O. (2004). Development and validation of methods for environmental monitoring of cyclophosphamide in workplaces. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(12), 979-984.
275. Connor, T. H., Anderson, R. W., Sessink, P. J., Broadfield, L., & Power, L. A. (1999). Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 56(14), 1427-1432.
276. Connor, T. H., Anderson, R. W., Sessink, P. J., & Spivey, S. M. (2002). Effectiveness of a closed-system device in containing surface contamination with cyclophosphamide and ifosfamide in an iv admixture area. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 59(1), 68-72.
277. Nygren, O., Gustavsson, B., Ström, L., & Friberg, A. (2002). Cisplatin contamination observed on the outside of drug vials. *Annals of Occupational Hygiene*, 46(6), 555-557.
278. Schmaus, G., Schierl, R., & Funck, S. (2002). Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography-mass spectrometry and voltammetry. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 59(10), 956-961.
279. Castiglia, L., Miraglia, N., Pieri, M., Simonelli, A., Basilicata, P., Genovese, G., . . . Scafarto, M. V. (2008). Evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs in an Italian hospital oncological department. *Journal of Occupational Health*, 50(1), 48-56.
280. Osawa, T., Naito, T., Suzuki, N., Imai, K., Nakanishi, K., & Kawakami, J. (2011). Validated method using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of contamination of the exterior surface of vials containing platinum anticancer drugs. *Talanta*, 85(3), 1614-1620.

281. Sessink, P. J., Connor, T. H., Jorgenson, J. A., & Tyler, T. G. (2011). Reduction in surface contamination with antineoplastic drugs in 22 hospital pharmacies in the US following implementation of a closed-system drug transfer device. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 17(1), 39-48.
282. Zock, M. D., Soefje, S., & Rickabaugh, K. (2011). Evaluation of surface contamination with cyclophosphamide following simulated hazardous drug preparation activities using two closed-system products. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 17(1), 49-54.
283. Álvarez, A. G., Soria, M. A. L., Marí, A. A., Gómez, M. A. M., Oltra, B. P., & Torres, N. V. J. (2012). Exposición a fármacos citotóxicos en el personal sanitario. *Farmacia Hospitalaria*, 36(5), 368-373.
284. Hedmer, M., & Wohlfart, G. (2012). Hygienic guidance values for wipe sampling of antineoplastic drugs in Swedish hospitals. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(7), 1968-1975.
285. Nussbaumer, S., Geiser, L., Sadeghipour, F., Hochstrasser, D., Bonnabry, P., Veuthey, J., & Fleury-Souverain, S. (2012). Wipe sampling procedure coupled to LC-MS/MS analysis for the simultaneous determination of 10 cytotoxic drugs on different surfaces. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(8), 2499-2509.
286. Yuki, M., Sekine, S., Takase, K., Ishida, T., & Sessink, P. J. (2013). Exposure of family members to antineoplastic drugs via excreta of treated cancer patients. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 19(3), 208-217.
287. Sessink, P. J., Trahan, J., & Coyne, J. W. (2013). Reduction in surface contamination with cyclophosphamide in 30 US hospital pharmacies following implementation of a closed-system drug transfer device. *Hospital Pharmacy*, 48(3), 204-212.
288. Fleury-Souverain, S., Nussbaumer, S., Mattiuzzo, M., & Bonnabry, P. (2014). Determination of the external contamination and cross-contamination by cytotoxic drugs on the surfaces of vials available on

- the Swiss market. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 20(2), 100-111.
289. Böhlandt, A., & Schierl, R. (2016). Benefits of wipe sampling: Evaluation of long-term 5-fluorouracil and platinum monitoring data. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, 1(3), 139-150.
290. Hetzel, T., Vom Eyser, C., Tuerk, J., Teutenberg, T., & Schmidt, T. C. (2016). Micro-liquid chromatography mass spectrometry for the analysis of antineoplastic drugs from wipe samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(28), 8221-8229.
291. Schierl, R., Masini, C., Groeneveld, S., Fischer, E., Böhlandt, A., Rosini, V., & Paolucci, D. (2016). Environmental contamination by cyclophosphamide preparation: Comparison of conventional manual production in biological safety cabinet and robot-assisted production by APOTECaChemo. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 22(1), 37-45.
292. Böhlandt, A., Sverdel, Y., & Schierl, R. (2017). Antineoplastic drug residues inside homes of chemotherapy patients. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(4), 757-765.
293. Colombo, M., Jeronimo, M., Astrakianakis, G., Apte, C., & Hon, C. (2017). Wipe sampling method and evaluation of environmental variables for assessing surface contamination of 10 antineoplastic drugs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Annals of Work Exposures and Health*, 61(8), 1003-1014.
294. Blahova, L., Dolezalova, L., Kuta, J., Kozakova, S., & Blaha, L. (2020). Hospitals and pharmacies as sources of contamination by cytostatic pharmaceuticals: Long-term monitoring in the Czech Republic. In E. Heath, M. Isidori, T. Kosjek & M. Filipič (Eds.), *Fate and effects of anticancer drugs in the environment* (pp. 57-70): Springer.
295. Korczowska, E., Crul, M., Tuerk, J., & Meier, K. (2020). Environmental contamination with cytotoxic drugs in 15 hospitals from 11 European

countries—results of the MASHA project. *European Journal of Oncology Pharmacy*, 3(2), e24.

296. Mucci, N., Dugheri, S., Farioli, A., Garzaro, G., Rapisarda, V., Campagna, M., . . . Arcangeli, G. (2020). Occupational exposure to antineoplastic drugs in hospital environments: Potential risk associated with contact with cyclophosphamide-and ifosfamide-contaminated surfaces. *Medycyna Pracy*, 71(5), 519-529.
297. Verscheure, E., Creta, M., Vanoirbeek, J., Zakia, M., Abdesselam, T., Lebegge, R., . . . Godderis, L. (2020). Environmental contamination and occupational exposure of Algerian hospital workers. *Frontiers in Public Health*, 8, 374.
298. Gupta, P. K. (2016). Fundamentals of toxicology: Essential concepts and applications. Chapter 13 Genotoxicity. *Academic Press*.
299. International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization. (1985). Environmental health criteria 51: Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals.
300. International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization. (2001). Environmental health criteria 222. Biomarkers in risk assessment: Validity and validation.
301. Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., . . . Tice, R. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172. doi:[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1)
302. OECD. (2016). Test no. 473: In vitro mammalian chromosomal aberration test, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: doi:<https://doi.org/10.1787/9789264264649-en>
303. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084.

304. Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1-2), 11-18. doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00041-4)
305. OECD. (2016). Test no. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: OECD Publishing. doi:<https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>
306. Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36. doi:[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)
307. Speit, G. (2013). Does the recommended lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for human biomonitoring actually detect DNA damage induced by occupational and environmental exposure to genotoxic chemicals? *Mutagenesis*, 28(4), 375-380. doi:<https://doi.org/10.1093/mutage/get026>
308. Ladeira, C., Viegas, S., Carolino, E., Gomes, M. C., & Brito, M. (2015). Correlation between the genotoxicity endpoints measured by two different genotoxicity assays: Comet assay and CBMN assay. *Front.Genet. Conference Abstract: ICAW 2015 - 11th International Comet Assay Workshop*. doi:10.3389/conf.fgene.2015.01.00027
309. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., & Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93-100. doi:<https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>
310. Iarmarcovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsiere, T., & Bonassi, S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(3), 274-283. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.006>

311. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., . . . Barale, R. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631. doi:<https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
312. Pardini, B., Viberti, C., Naccarati, A., Allione, A., Oderda, M., Critelli, R., . . . Gontero, P. (2017). Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 116(2), 202-210. doi:<https://doi.org/10.1038/bjc.2016.411>
313. Nersesyan, A., Fenech, M., Bolognesi, C., Mišák, M., Setayesh, T., Wultsch, G., . . . Knasmueller, S. (2016). Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.05.003>
314. OECD. (2020). Test no. 471: Bacterial reverse mutation test. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: *OECD Publishing*. doi:<https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
315. OECD. (1997). Test no. 486: Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells in vivo. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 4. Paris: *OECD Publishing*. doi:<https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264071520-en>
316. OECD. (2016). Test no. 476: In vitro mammalian cell gene mutation tests using the hprt and xprt genes, OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 4. Paris: *OECD Publishing*. doi:<https://doi.org/10.1787/9789264264809-en>
317. OECD. (2016). Test no. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: *OECD Publishing*. doi:<https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>

318. Collins, A. R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 794-800.
319. Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249.  
doi:<https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
320. Gunasekarana, V., Raj, G. V., & Chand, P. (2015). A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(3), GE01-GE05.  
doi:10.7860/JCDR/2015/12062.5622
321. Fuchs, J., Hengstler, J. G., Jung, D., Hiltl, G., Konietzko, J., & Oesch, F. (1995). DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 342(1-2), 17-23.
322. Ündeğer, Ü, Başaran, N., Kars, A., & Güç, D. (1999). Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(2), 277-285.
323. Kopjar, N., & Garaj-Vrhovac, V. (2001). Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: A study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis*, 16(1), 71-78.
324. Deng, H., Zhang, M., He, J., Wu, W., Jin, L., Zheng, W., . . . Wang, B. (2005). Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points. *Mutagenesis*, 20(5), 351-357.
325. Laffon, B., Teixeira, J. P., Silva, S., Loureiro, J., Torres, J., Pasaro, E., . . . Mayan, O. (2005). Genotoxic effects in a population of nurses handling antineoplastic drugs, and relationship with genetic polymorphisms in DNA repair enzymes. *American Journal of Industrial Medicine*, 48(2), 128-136.

326. Hongping, D., Jianlin, L., Meibian, Z., Wei, W., Lifen, J., Shijie, C., . . . Jiliang, H. (2006). Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to vincristine with four genetic tests. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 599(1-2), 152-159.
327. Yoshida, J., Kosaka, H., Tomioka, K., & Kumagai, S. (2006). Genotoxic risks to nurses from contamination of the work environment with antineoplastic drugs in Japan. *Journal of Occupational Health*, 48(6), 517-522.
328. Cavallo, D., Ursini, C. L., Rondinone, B., & Iavicoli, S. (2009). Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(9), 781-790.
329. Buschini, A., Villarini, M., Feretti, D., Mussi, F., Dominici, L., Zerbini, I., . . . Carrieri, M. (2013). Multicentre study for the evaluation of mutagenic/carcinogenic risk in nurses exposed to antineoplastic drugs: Assessment of DNA damage. *Occupational and Environmental Medicine*, 70(11), 789-794.
330. Gajski, G., Gerić, M., Domijan, A., & Garaj-Vrhovac, V. (2016). Combined cyto/genotoxic activity of a selected antineoplastic drug mixture in human circulating blood cells. *Chemosphere*, (165), 529-538.
331. Gajski, G., Ladeira, C., Gerić, M., Garaj-Vrhovac, V., & Viegas, S. (2018). Genotoxicity assessment of a selected cytostatic drug mixture in human lymphocytes: A study based on concentrations relevant for occupational exposure. *Environmental Research*, (161), 26-34.
332. Santos, A. N., Oliveira, R. J., Pessatto, L. R., Gomes, R. d. S., & Freitas, Carlos Alberto Ferreira de. (2020). Biomonitoring of pharmacists and nurses at occupational risk from handling antineoplastic agents. *International Journal of Pharmacy Practice*, 28(5), 506-511.

333. Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949-968. doi:<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
334. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., . . . Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:33.O.CO;2-J
335. Kaltenbach, J. P., Kaltenbach, M. H., & Lyons, W. B. (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Experimental Cell Research*, 15(1), 112-117.
336. Páez, L. C. C., Quintero, I. D. P., Suarez, M. C. U., Mora, R. M. S., Jiménez, M. G., & Cano, L. A. M. (2015). Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con chlamydia trachomatis. *Nova*, 13(23)
337. Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., & Pandey, A. K. (2018). Models and methods for in vitro toxicity. *In vitro toxicology* (pp. 45-65): Elsevier.
338. Al-Sabah, A., Jessop, Z. M., Whitaker, I. S., & Thornton, C. (2018). Cell preparation for 3D bioprinting. *3D bioprinting for reconstructive surgery* (pp. 75-88): Elsevier.
339. Fang, I., & Trewyn, B. G. (2012). Application of mesoporous silica nanoparticles in intracellular delivery of molecules and proteins. *Methods in enzymology* (pp. 41-59): Elsevier.
340. Freeberg, M. A. T., Kallenbach, J. G., & Awad, H. A. (2019). In Narayan R. (Ed.), *Assessment of cellular responses of tissue constructs in vitro in regenerative engineering*. Amsterdam; Sara Burgerhartstraat 25, PO BOX 211, 1000 AE Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science BV. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.99898-2.

341. Peropadre López, A. (2014). Estudio in vitro de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid.
342. Nemes, Z., Dietz, R., Lüth, J. B., Gomba, S., Hackenthal, E., & Gross, F. (1979). The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*, 35(11), 1475-1476.
343. Checa Rojas, A. (2018). Tinción de cristal violeta (0,5%) en cultivo de células adherentes. *Conogasi, Conocimiento para la vida*. Recuperado de <http://conogasi.org/articulos/tincion-de-cristal-violeta-0-5-en-cultivo-de-celulas-adherentes/>
344. Cayota, A. (2017). Estudio de la viabilidad celular en distintas líneas tumorales expuestas a tincura de Basquädé. Institut Pasteur de Montevideo. Unidad de Genómica Funcional. Recuperado de <https://www.basquade.com/wp-content/uploads/2017/10/informe-basquade.pdf>
345. de Castro Ríos, A. (2007). Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem a la determinación de antidepresivos en plasma y fluido oral (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
346. Lendoiro, E., Quintela, Ó, de Castro, A., Cruz, A., López-Rivadulla, M., & Concheiro, M. (2012). Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. *Forensic Science International*, 217(1-3), 207-215.
347. de Castro, A., Díaz, A., Piñeiro, B., Lendoiro, E., Cruz, A., López-Rivadulla, M., & Concheiro, M. (2013). Simultaneous determination of opiates, methadone, amphetamines, cocaine, and metabolites in human placenta and umbilical cord by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(12), 4295-4305.
348. de Castro, A., Lendoiro, E., Fernández-Vega, H., Steinmeyer, S., López-Rivadulla, M., & Cruz, A. (2014). Liquid chromatography tandem mass

spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device. *Journal of Chromatography A*, 1374, 93-101.

349. Paniagua-González, L., Díaz-Louzao, C., Lendoiro, E., Otero-Antón, E., Cadarso-Suárez, C., López-Rivadulla, M., . . . de-Castro-Ríos, A. (2020). Volumetric absorptive microsampling (vams) for assaying immunosuppressants from venous whole blood by lc-ms/ms using a novel atmospheric pressure ionization probe (unispray™). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113422.
350. Cobo-Golpe, M., de-Castro-Ríos, A., Cruz, A., Páramo, M., López-Rivadulla, M., & Lendoiro, E. (2020). Determination of antipsychotic drugs in nails and hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of their incorporation into keratinized matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 189, 113443.
351. López-Rabuñal, Á, Lendoiro, E., Concheiro, M., López-Rivadulla, M., Cruz, A., & de-Castro-Ríos, A. (2019). A LC-MS/MS method for the determination of common synthetic cathinones in meconium. *Journal of Chromatography B*, 1124, 349-355.
352. Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, Ó, Cruz, A., & López-Rivadulla, M. (2008). Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(6), 2329-2338.
353. Miller, J. M. (2009). Chromatography. En Andrews, David L. (Ed.), *Encyclopedia of Applied Spectroscopy* (pp. 1055-1102). Weinheim, Alemania: Wiley -VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. doi:<https://doi.org/10.1002/3527600434.eap064.pub2>
354. Manohar, M., & Marzinke, M. A. (2016). Application of chromatography combined with mass spectrometry in therapeutic drug monitoring.

- Clinical challenges in therapeutic drug monitoring* (pp. 45-70): Elsevier. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802025-8.00003-9>
355. Mukherjee, P. K. (2019). High-performance liquid chromatography for analysis of herbal drugs. *Quality control and evaluation of herbal drugs: Evaluating natural products and traditional medicine* (pp. 421-458): Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00010-7>
356. Cuadra Rodríguez, L. M. Cromatografía líquida de alta eficacia. Recuperado de [https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_liquida\\_de\\_alta\\_eficacia.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf)
357. Waters Corporation. Sistema ACQUITY UPLC: Waters. Recuperado de [https://www.waters.com/waters/es\\_ES/ACQUITY-UPLC-/nav.htm?cid=514207&locale=es\\_ES#Caracter%C3%ADsticas](https://www.waters.com/waters/es_ES/ACQUITY-UPLC-/nav.htm?cid=514207&locale=es_ES#Caracter%C3%ADsticas)
358. Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.
359. Kyle, P. B. (2017). Toxicology: GCMS. *Mass spectrometry for the clinical laboratory* (pp. 131-163): Elsevier. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9>
360. Guisán, M. C. (2006). Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas simple y en tandem a la determinación de derivados anfetamínicos y otras drogas de abuso en medios biológicos (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
361. Quintela Jorge, Ó. (2004). Aplicación de la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas a la determinación de compuestos benzodiazepínicos en plasma y fluido oral. Implicaciones en los ámbitos de la toxicología clínica y forense (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.

362. Mukherjee, P. K. (2019). LC–MS: A rapid technique for understanding the plant metabolite analysis. *Quality control and evaluation of herbal drugs: Evaluating natural products and traditional medicine* (pp. 459-479): Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00011-9>
363. Clarke, W. (2017). Mass spectrometry in the clinical laboratory: Determining the need and avoiding pitfalls. *Mass spectrometry for the clinical laboratory* (pp. 1-15): Elsevier. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8>
364. Lynch, K. L. (2017). Toxicology: Liquid chromatography mass spectrometry. *Mass spectrometry for the clinical laboratory* (pp. 109-130): Elsevier. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00006-7>
365. Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A., & López-Rivadulla, M. (2005). Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista De Toxicología*, 22(1), 7-14.
366. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Espectrometría de masas. Recuperado de [https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria\\_de\\_masas.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf)
367. Laboratorio Nacional de Investigaciones en Forense Nuclear. Gobierno de México. Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución con espectrómetro de masas (UPLC-MS). Recuperado de [https://www.inin.gob.mx/mini\\_sitios/tercer\\_plano.cfm?cve\\_area=LAB\\_FON&codigo\\_opc=180005005](https://www.inin.gob.mx/mini_sitios/tercer_plano.cfm?cve_area=LAB_FON&codigo_opc=180005005)
368. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. doi:[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

369. Sviežená, B., Gálová, E., Kusenda, B., Slaninová, M., Vlček, D., & Dušinská, M. (2004). The comet assay and the troubles with its application in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Czech Phycology*, 4(1), 163-174.
370. Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA repair mechanisms* (pp. 465-468): Elsevier.
371. Cook, P. R., Brazell, I. A., & Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*, 22(2), 303-324.
372. Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S. A., O'Neill Gaivão, I., & Collins, A. (2014). Comet assay to measure DNA repair: Approach and applications. *Frontiers in Genetics*, 5, 288. doi:10.3389/fgene.2014.00288
373. Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
374. Møller, P., Knudsen, L. E., Loft, S., & Wallin, H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(10), 1005-1015.
375. Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., . . . Thybaud, V. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.
376. Pfuhler, S., & Uwe Wolf, H. (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(3), 196-201. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)27:33.O.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:3<196::AID-EMM1098-2280(1996)27:33.O.CO;2-D)

377. Merk, O., & Speit, G. (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(2), 167-172. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)33:23.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:23.0.CO;2-D)
378. Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., & Windebank, S. (1998). The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13(1), 89-94. doi:<https://doi.org/10.1093/mutage/13.1.89>
379. Shaposhnikov, S., Thomsen, P. D., & Collins, A. R. (2011). Combining fluorescent in situ hybridization with the comet assay for targeted examination of DNA damage and repair. *DNA damage detection in situ, ex vivo, and in vivo* (pp. 115-132): Springer. doi:[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_10)
380. Santos, S. J., Singh, N. P., & Natarajan, A. T. (1997). Fluorescence in situ hybridization with comets. *Experimental Cell Research*, 232(2), 407-411. doi:<https://doi.org/10.1006/excr.1997.3555>
381. Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220-233.
382. Şardaş, S., Aygün, N., Gamli, M., Ünal, Y., Ünal, N., Berk, N., & Karakaya, A. E. (1998). Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 418(2-3), 93-100.
383. Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Sallette, J., . . . Collins, A. (2011). The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis*, 26(3), 393-399.
384. Kassie, F., Parzefall, W., & Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring

- studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(1), 13-31.
385. ICH. (2011). Guidance S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, ICH Expert Working Group*,
386. Gajski, G., Langie, S., & Zhanataev, A. (2020). Recent applications of the comet assay: A report from the international comet assay workshop 2019. *Toxicology Letters*, 333, 1-3.
387. Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K., & Seo, Y. R. (2013). Recent advances in in vivo genotoxicity testing: Prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 277.
388. Collins, A. R., & Azqueta, A. (2012). DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 736(1-2), 122-129.
389. Singh, N. P. (2000). A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental Cell Research*, 256(1), 328-337.
390. Yin, L., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y., & Yang, Y. (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, 10(1), 68.
391. Escobar, L., & Aristizábal, F. A. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173-180.

392. Bach, P. H., Obatomi, D. K., & Brant, S. (1996). In vitro models for nephrotoxicity screening and risk assessment. *In vitro methods in pharmaceutical research* (pp. 55-101): Academic Press London.
393. Escobar, L., Alfonso, P. A., & Aristizábal, F. A. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 11(2), 49-56.
394. Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M. N., Oosthuizen, C. B., & Berrington, D. (2013). Viability reagent, PrestoBlue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *International Journal of Microbiology*, 2013
395. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb. prot095497.
396. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., & Watanabe, M. (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*, 36(2), 47-50.
397. Capusiri, E. S., Pinell, G. R., Huallpara, J. C. T., & Turba, A. G. (2008). Método colorimétrico-XTT: Como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. Colorimetric method-XTT: As a tool for high performance evaluation of substances with leishmanicidal activity. *Biofarbo*, 16, 21.
398. Promega. (2001). CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay. Recuperado de <http://101.200.202.226/files/prod/manuals/201401/06/541919001.pdf>.
399. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., . . . Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17), 4827-4833.

400. Buttke, T. M., McCubrey, J. A., & Owen, T. C. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods*, 157(1-2), 233-240.
401. Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7), 207-212.
402. Ndaw, S., Denis, F., Marsan, P., d'Almeida, A., & Robert, A. (2010). Biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil: Urinary  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine assay by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in health care personnel. *Journal of Chromatography B*, 878(27), 2630-2634.
403. Odraska, P., Dolezalova, L., Kuta, J., Oravec, M., Piler, P., & Blaha, L. (2013). Evaluation of the efficacy of additional measures introduced for the protection of healthcare personnel handling antineoplastic drugs. *Annals of Occupational Hygiene*, 57(2), 240-250.
404. Dhersin, A., Atgé, B., Martinez, B., Titier, K., Rousset, M., El Moustaph, Mohamed Sidatt Cheikh, . . . Canal-Raffin, M. (2018). Biomonitoring of occupational exposure to 5-FU by assaying  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine in urine with a highly sensitive UHPLC-MS/MS method. *Analyst*, 143(17), 4110-4117.
405. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. (2013). Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452-474.
406. US Food and Drug Administration. (2018). Bioanalytical method validation guidance for industry. *US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, and Center for Veterinary Medicine*. Recuperado de <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

407. International Conference of Harmonization. (2019). ICH harmonised guideline: Bioanalytical method validation M10. Recuperado de [https://www.wrib.org/PDFs/ICH\\_M10\\_BMV\\_Draft\\_Guideline-190227.pdf](https://www.wrib.org/PDFs/ICH_M10_BMV_Draft_Guideline-190227.pdf)
408. European Medicines Agency. (2011). Guideline on bioanalytical method validation. Recuperado de [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
409. Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855. Recuperado de <http://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>
410. US Food and Drug Administration. (2013). Draft guidance for industry for bioanalytical method validation. Recuperado de <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/UCM368107.PDF>
411. European Commission. (2002). Commission decision of 12 august 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, 8-36.
412. Sottani, C., Turci, R., Schierl, R., Gaggeri, R., Barbieri, A., Violante, F. S., & Minoia, C. (2007). Simultaneous determination of gemcitabine, taxol, cyclophosphamide and ifosfamide in wipe samples by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Protocol of validation and uncertainty of measurement. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(7), 1289-1296.
413. Jeronimo, M., Colombo, M., Astrakianakis, G., & Hon, C. (2015). A surface wipe sampling and LC-MS/MS method for the simultaneous detection of six antineoplastic drugs commonly handled by healthcare workers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(23), 7083-7092.

414. Tuerk, J., Kiffmeyer, T. K., Hadtstein, C., Heinemann, A., Hahn, M., Stuetzer, H., . . . Eickmann, U. (2011). Development and validation of an LC–MS/MS procedure for environmental monitoring of eight cytostatic drugs in pharmacies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *91*(12), 1178-1190.
415. Larson, R. R., Khazaeli, M. B., & Dillon, H. K. (2002). Monitoring method for surface contamination caused by selected antineoplastic agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *59*(3), 270-277.
416. Böhlandt, A., Groeneveld, S., Fischer, E., & Schierl, R. (2015). Cleaning efficiencies of three cleaning agents on four different surfaces after contamination by gemcitabine and 5-fluorouracil. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, *12*(6), 384-392.
417. Smith, J. P., Sammons, D. L., Robertson, S. A., Pretty, J. R., DeBord, D. G., Connor, T. H., & Snawder, J. E. (2016). Detection and measurement of surface contamination by multiple antineoplastic drugs using multiplex bead assay. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, *22*(1), 60-67.
418. Pretty, J. R., Connor, T. H., Spasojevic, I., Kurtz, K. S., McLaurin, J. L., B'Hymer, C., & DeBord, D. G. (2012). Sampling and mass spectrometric analytical methods for five antineoplastic drugs in the healthcare environment. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, *18*(1), 23-36.
419. Müller-Ramírez, C., Squibb, K., & McDiarmid, M. (2016). Accessible analytical methodology for assessing workplace contamination of antineoplastic drugs in limited-resource oncology health-care settings. *Journal of Analytical Science and Technology*, *7*(1), 11.
420. Gómez-Canela, C., Ventura, F., Caixach, J., & Lacorte, S. (2014). Occurrence of cytostatic compounds in hospital effluents and wastewaters, determined by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(16), 3801-3814.

421. Olalla, A., Negreira, N., de Alda, M. L., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2018). A case study to identify priority cytostatic contaminants in hospital effluents. *Chemosphere*, *190*, 417-430.
422. Santana-Viera, S., Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Kabir, A., & Furton, K. G. (2017). Optimization and application of fabric phase sorptive extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of cytostatic drug residues in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, *1529*, 39-49.
423. Weissbrodt, D., Kovalova, L., Ort, C., Pazhepurackel, V., Moser, R., Hollender, J., . . . McArdeell, C. S. (2009). Mass flows of X-ray contrast media and cytostatics in hospital wastewater. *Environmental Science & Technology*, *43*(13), 4810-4817.
424. Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2013). Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(18), 5937-5952.
425. Negreira, N., Mastroianni, N., de Alda, M. L., & Barceló, D. (2013). Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta*, *116*, 290-299.
426. Gómez-Canela, C., Cortés-Francisco, N., Ventura, F., Caixach, J., & Lacorte, S. (2013). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry as analytical tools to characterize multi-class cytostatic compounds. *Journal of Chromatography A*, *1276*, 78-94.
427. Nussbaumer, S., Fleury-Souverain, S., Antinori, P., Sadeghipour, F., Hochstrasser, D. F., Bonnabry, P., . . . Geiser, L. (2010). Simultaneous

- quantification of ten cytotoxic drugs by a validated LC–ESI–MS/MS method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(7-8), 3033-3042.
428. Guichard, N., Fekete, S., Guillarme, D., Bonnabry, P., & Fleury-Souverain, S. (2019). Computer-assisted UHPLC–MS method development and optimization for the determination of 24 antineoplastic drugs used in hospital pharmacy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 395-401.
429. Larson, R. R., Khazaeli, M. B., & Dillon, H. K. (2003). Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 18(2), 109-119.
430. Kiffmeyer, T. K., Kube, C., Opiolka, S., Schmidt, K. G., Schöppe, G., & Sessink, P. J. (2002). Vapour pressures, evaporation behaviour and airborne concentrations of hazardous drugs: Implications for occupational safety. *Pharmaceutical Journal*, 268, 331-337.
431. Roberts, S., Khammo, N., McDonnell, G., & Sewell, G. J. (2006). Studies on the decontamination of surfaces exposed to cytotoxic drugs in chemotherapy workstations. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 12(2), 95-104.
432. Polovich, M., & Clark, P. C. (2012). (2012). Factors influencing oncology nurses' use of hazardous drug safe-handling precautions. Paper presented at the *Oncology Nursing Forum*, 39(3)
433. Kieffer, C., Verhaeghe, P., Lagrassa, S., Grégoire, R., Moussaoui, Z., Casteras-Ducros, C., . . . Rathelot, P. (2015). Preventing the contamination of hospital personnel by cytotoxic agents: Evaluation and training of the para-professional healthcare workers in oncology units. *European Journal of Cancer Care*, 24(3), 404-410.
434. Boiano, J. M., Steege, A. L., & Sweeney, M. H. (2014). Adherence to safe handling guidelines by health care workers who administer antineoplastic drugs. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 11(11), 728-740.

435. Boiano, J. M., Steege, A. L., & Sweeney, M. H. (2015). Adherence to precautionary guidelines for compounding antineoplastic drugs: A survey of nurses and pharmacy practitioners. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 12(9), 588-602.
436. DeJoy, D. M., Smith, T. D., Woldu, H., Dyal, M., Steege, A. L., & Boiano, J. M. (2017). Effects of organizational safety practices and perceived safety climate on PPE usage, engineering controls, and adverse events involving liquid antineoplastic drugs among nurses. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(7), 485-493.
437. Silver, S. R., Steege, A. L., & Boiano, J. M. (2016). Predictors of adherence to safe handling practices for antineoplastic drugs: A survey of hospital nurses. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 13(3), 203-212.
438. Polovich, M. (2010). Nurses' use of hazardous drug safe handling precautions (Nursing Dissertation). Georgia State University
439. Hon, C., Teschke, K., & Shen, H. (2015). Health care workers' knowledge, perceptions, and behaviors regarding antineoplastic drugs: Survey from British Columbia, Canada. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 12(10), 669-677.
440. Harrison, B. R., Peters, B. G., & Bing, M. R. (2006). Comparison of surface contamination with cyclophosphamide and fluorouracil using a closed-system drug transfer device versus standard preparation techniques. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 63(18), 1736-1744.
441. Spivey, S., & Connor, T. H. (2003). Determining sources of workplace contamination with antineoplastic drugs and comparing conventional IV drug preparation with a closed system. *Hospital Pharmacy*, 38(2), 135-139.
442. Gómez-Álvarez, S., Porta-Oltra, B., Hernández-Griso, M., Pérez-Labaña, F., & Climente-Martí, M. (2016). Evaluación de dos sistemas cerrados en

- el proceso de elaboración de quimioterapia parenteral. *Farmacia Hospitalaria*, 40(1), 36-43.
443. Naito, T., Osawa, T., Suzuki, N., Goto, T., Takada, A., Nakamichi, H., . . . Kawakami, J. (2012). Comparison of contamination levels on the exterior surfaces of vials containing platinum anticancer drugs in Japan. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(11), 2043-2049.
444. Sessink, P. J., Wittenhorst, B. C., Anzion, R. B., & Bos, R. P. (1997). Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: Reevaluation after additional protective measures. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 52(3), 240-244.
445. Krämer, I., Federici, M., & Schierl, R. (2018). Environmental and product contamination during the preparation of antineoplastic drugs with robotic systems. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, 3(3), 153-164.
446. United States Pharmacopeia. USP< 797> guidebook to pharmaceutical compounding-sterile preparations. Paper presented at the *United States Pharmacopeial Convention*.
447. Connor, T. H. (2006). Hazardous anticancer drugs in health care: Environmental exposure assessment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076(1), 615-623.
448. Connor, T. H., Shults, M., & Fraser, M. P. (2000). Determination of the vaporization of solutions of mutagenic antineoplastic agents at 23 and 37 C using a desiccator technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 470(1), 85-92.
449. Fransman, W., Kager, H., Meijster, T., Heederik, D., Kromhout, H., Portengen, L., & Blaauboer, B. J. (2014). Leukemia from dermal exposure to cyclophosphamide among nurses in the Netherlands: Quantitative assessment of the risk. *Annals of Occupational Hygiene*, 58(3), 271-282.

450. Odraska, P., Mazurova, E., Dolezalova, L., & Blaha, L. (2011). In vitro evaluation of the permeation of cytotoxic drugs through reconstructed human epidermis and oral epithelium. *Klin Onkol*, 24, 195-202.
451. Connor, T. H., & Smith, J. P. (2016). New approaches to wipe sampling methods for antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, 1(3), 107-114.
452. Bos, J. D., & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology: Viewpoint*, 9(3), 165-169.
453. Kimmel, T. A., Sussman, R. G., Ku, R. H., & Ader, A. W. (2011). Developing acceptable surface limits for occupational exposure to pharmaceutical substances. *Journal of ASTM International*, 8(8), 1-6.
454. Khandavilli, S., & Panchagnula, R. (2007). Studies of the skin permeation of lipophilic drugs: Paclitaxel. *Die Pharmazie-an International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(6), 471-473.
455. Sottani, C., Tranfo, G., Faranda, P., & Minoia, C. (2005). Highly sensitive high-performance liquid chromatography/selective reaction monitoring mass spectrometry method for the determination of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of health care workers exposed to antineoplastic agents. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 19(19), 2794-2800.
456. Anilanmert, B., Sertler, S., Cavus, F., & Cengiz, S. (2015). Validated method for occupational cyclophosphamide monitoring using LC-MS/MS and a poroshell 120 column. *Chemical Papers*, 69(11), 1395-1401.
457. Yuki, M., Ishida, T., & Sekine, S. (2015). (2015). Secondary exposure of family members to cyclophosphamide after chemotherapy of

outpatients with cancer: A pilot study. Paper presented at the *Oncol Nurs Forum*, 42(6) 665-671.

458. Sessink, P., Scholtes, M. M., Anzion, R., & Bos, R. P. (1993). Determination of cyclophosphamide in urine by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 616(2), 333-337.
459. B'Hymer, C., & Cheever, K. L. (2010). Evaluation of a procedure for the simultaneous quantification of 4-ketocyclophosphamide, cyclophosphamide, and ifosfamide in human urine. *Journal of Chromatographic Science*, 48(5), 328-333.
460. Sottani, C., Zucchetti, M., Zaffaroni, M., Bettinelli, M., & Minoia, C. (2004). Validated procedure for simultaneous trace level determination of the anti-cancer agent gemcitabine and its metabolite in human urine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(10), 1017-1023.
461. Sottani, C., Tranfo, G., Bettinelli, M., Faranda, P., Spagnoli, M., & Minoia, C. (2004). Trace determination of anthracyclines in urine: A new high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for assessing exposure of hospital personnel. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(20), 2426-2436.
462. Kasel, D., Jetter, A., Harlfinger, S., Gebhardt, W., & Fuhr, U. (2004). Quantification of cyclophosphamide and its metabolites in urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(13), 1472-1478.
463. Xerencia de Xestión Integrada de Santiago. (2017). Memoria 2017 servicio de farmacia. Servicio Gallego de Salud (SERGAS).
464. Xerencia de Xestión Integrada de Santiago. (2018). Memoria 2018 servicio de farmacia. Servicio Gallego de Salud (SERGAS).

465. Wallemacq, P. E., Capron, A., Vanbinst, R., Boeckmans, E., Gillard, J., & Favier, B. (2006). Permeability of 13 different gloves to 13 cytotoxic agents under controlled dynamic conditions. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 63(6), 547-556.
466. Connor, T. H. (1999). Permeability of nitrile rubber, latex, polyurethane, and neoprene gloves to 18 antineoplastic drugs. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 56(23), 2450-2453.
467. Sundström, C., & Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer*, 17(5), 565-577.
468. ATCC. U-937 product sheet. Recuperado de [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-1593.2.aspx?geo\\_country=es](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-1593.2.aspx?geo_country=es)
469. Hedmer, M., Höglund, P., Cavallin-Ståhl, E., Albin, M., & Jönsson, B. A. (2008). Validation of urinary excretion of cyclophosphamide as a biomarker of exposure by studying its renal clearance at high and low plasma concentrations in cancer patients. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 81(3), 285-293.
470. Gajski, G., Gerić, M., Žegura, B., Novak, M., Nunić, J., Bajrektarević, D., . . . Filipič, M. (2016). Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14739-14750.
471. Spanswick, V. J., Hartley, J. M., & Hartley, J. A. (2010). Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Drug-DNA interaction protocols* (pp. 267-282): Springer.
472. Brulikova, L., Hlavac, J., & Hradil, P. (2012). DNA interstrand cross-linking agents and their chemotherapeutic potential. *Current Medicinal Chemistry*, 19(3), 364-385.

473. Błasiak, J., Kowalik, J., Małeczka-Panas, E., Drzewoski, J., & Wojewódzka, M. (2000). DNA damage and repair in human lymphocytes exposed to three anticancer platinum drugs. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20(3), 119-131.
474. Zhang, J., Bao, J., Wang, R., Geng, Z., Chen, Y., Liu, X., . . . Liu, G. (2016). A multicenter study of biological effects assessment of pharmacy workers occupationally exposed to antineoplastic drugs in pharmacy intravenous admixture services. *Journal of Hazardous Materials*, (315), 86-92.
475. Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R. H., Mann, M., & Mersch-Sundermann, V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 566(3), 209-229.





## **VII. CONCLUSIONS**



1. The present Thesis explores possible occupational exposure to some of the most common cytostatic drugs used in clinical practice through the analysis of markers of environmental and biological exposure, and biomarkers of effect.
2. A LC-MS/MS method for the analysis of 12 cytostatic drugs (gemcitabine, dacarbazine, methotrexate, irinotecan, doxorubicinol, doxorubicin, epirubicin, cyclophosphamide, etoposide, vinorelbine, docetaxel and paclitaxel) in work surfaces and bracelets was developed, validated and applied to real samples.
3. Results showed large contamination of the preparation area in the worktable of the BSC, floor under BSC, entrance floor, boxes used for dispensing preparations, trolleys, benches and drug vials. Contamination was also widespread to adjacent areas. Cyclophosphamide, gemcitabine, irinotecan and paclitaxel were the cytostatic drugs most frequently detected. The external surface of drug blister packs in the oral drug dispensing area also showed contamination. Different surfaces of the administration area were also contaminated after the administration session. Toilet and toilet floor in patient areas displayed extensive contamination that persisted after cleaning.
4. A LC-MS/MS method for the analysis of urine samples of workers was also developed, validated and applied to real samples.
5. None of the monitored cytostatic drugs was detected in worker's urine samples above the limit of detection during any of the three non-consecutive days belonging to the same working week.
6. DNA damage and repair of a selection of four cytostatic drugs (cyclophosphamide, 5-fluoruracil, etoposide and cisplatin) was assessed using the comet assay in a human lymphocyte cell line.
7. Results did not show statistically significant differences in DNA damage between the different concentrations of the compounds tested individually or in a mixture, after 4 hours, 48 hours or 1 week of exposure, with the exception of etoposide, which showed statistically significant higher damage at concentrations of 1000 and 10000 pg/mL after 4 hours, compared to control. The DNA damage repair kinetics was not statistically significant compared to control.

8. All workers in direct or indirect contact with antineoplastic drugs (from reception to cleaning) should wear PPE, since contamination is present in several stages of their manipulation. A change in work practices and engineering controls must be introduced to reduce contamination and prevent spread. PPE are effective to prevent biological exposure. A monitoring program must be implemented to control the levels of exposure and maintain workers awareness. Biomarkers of effect should be monitored in exposed workers for a better understanding of the risk of exposure.





## **ANEXOS**



## Anexo 1:

### FOLLA DE INFORMACIÓN AO/Á PARTICIPANTE ADULTO/A

**TÍTULO DO ESTUDO:** *Avaliación da exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en persoal sanitario*

**INVESTIGADOR:** Manuel María López-Rivadulla Lamas

**CENTRO:** Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro. Facultade de Medicina.

Este documento ten por obxecto ofrecerlle información sobre un **estudo de investigación** no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo **Comité de Ética da Investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)**.

Se decide participar no mesmo, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre o mesmo. Se así o desexa, pode levar o documento, consúltalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vd. pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen obriga de dar explicacións.

#### Cal é a finalidade do estudo?

*O propósito do estudo céntrase en determinar se o persoal sanitario en contacto con axentes citostáticos se encontra exposto ós mesmos, mediante a determinación dos niveis en oriniños, antebrazos e superficies de traballo. Este estudo faise necesario para determinar o nivel de exposición dos traballadores e tomar as medidas necesarias para minimizar o risco de exposición. Determinarase a exposición a unha serie de fármacos citostáticos entre os que se inclúen: Dacarbazina, Gemcitabina, Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino, Temozolomida, Ciclofosfamida, Pemetrexed, Metotrexato, Epirubicina, Doxorubicina, Irinotecán, Vinorelbina, Capecitabina, Etoposido, Docetaxel, Paclitaxel e 5-Fluorouracilo. Tamén se tomarán mostras de sangue para avaliar o posible dano sobre o organismo causado por estes axentes. Para elo, empregárase o ensaio cometa que mediante a medición das roturas na cadea do ADN permite estudar o dano xenotóxico e a capacidade de reparación.*

#### Por que me ofrecen participar a min?

*Vostede é convidado a participar porque como persoal sanitario se atopa en contacto/manexa fármacos citostáticos ou si é grupo control porque non está en contacto nin manexa fármacos citostáticos.*

#### En que consiste a miña participación?

*A participación consistirá na obtención de datos demográficos (idade, sexo, fumador) e relacionados co posto de traballo (formación, actividade desenvolvida, citostáticos manexados, equipos de protección usados, método de traballo), e a obtención de mostras de oriniños antes e despois da quenda de traballo (3 días alternos da semana, en 2 semanas pertencentes a distintos meses), mostras dérmicas para o que se colocarán unhas gasas nos antebrazos dos traballadores participantes desde o comezo ata o remate da xornada laboral (este proceso realizarase en 3 días alternos da semana, en 2 semanas pertencentes a distintos meses), e mostras de sangue (un tubo de sangue por participante e semana en dúas semanas pertencentes a distintos meses). Tódalas mostras se tomarán nesas 2 semanas do período de estudo.*

*As mostras serán analizadas no Laboratorio de Toxicoloxía no Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro da Universidade de Santiago de Compostela.*

*Non se contactará co participante para obter novas mostras unha vez rematado o estudo.*

*As mostras biolóxicas/non biolóxicas recollidas someteranse a procedementos de extracción e análise para determinar a cantidade de analitos presentes.*

*No caso de controis (suxeitos non implicados no manexo/manipulación de citostáticos) recolleranse as mesmas mostras e aplícaráselles o mesmo procedemento de análise.*

A súa participación terá unha duración total estimada de 5 horas.

*Cada participante recibirá unha reunión informativa na que se explicarán as características e protocolo do estudo e terá que adicar tempo para cubrir unha pequena enquisa individual inicial e para a recollida de mostras: tempo de recollida, etiquetado e conservación de mostra de orniños; tempo de colocación, retirada, etiquetado e conservación de gasa dérmica; e tempo de extracción, etiquetado e conservación de mostra de sangue.*

O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada.

**Que molestias ou inconvenientes ten?**

*Os posibles riscos ou molestias estarán asociados á extracción de mostras de sangue, orniños e a colocación e mantemento de gasas nos antebrazos durante toda a quenda de traballo.*

**Obtere algún beneficio por participar?**

Non se espera que Vd. obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre a *exposición a axentes citostáticos entre o persoal sanitario*. Esta información poderá ser de utilidade nun futuro para outras persoas.

**Recibirei a información que se obteña do estudo?**

Se Vd. o desexa, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo.

Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispor deles, deberían ser comentados co seu médico.

**Publicaranse os resultados deste estudo?**

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

**Información referente aos seus datos/mostras:**

A obtención, tratamento, conservación, comunicación e cesión dos seus datos/mostras farase conforme ao disposto Regulamento Xeral de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016), a normativa española sobre protección de datos de carácter persoal vixente, a Lei 14/2007 de investigación biomédica e o RD 1716/2011.

A institución na que se desenvolve esta investigación é a responsable do tratamento dos seus datos, podendo contactar co Delegado/a de Protección de datos a través dos seguintes medios: enderezo electrónico: [manuel.lopez-rivadulla@usc.es](mailto:manuel.lopez-rivadulla@usc.es) / Tfno.: 881812205

Os datos/mostras necesarios para levar a cabo este estudo serán recollidos e conservados de modo:

- **Seudonimizados (Codificados)**, aseudonimización é o tratamento de datos persoais de maneira tal que non poden atribuírse a un/a interesado/a sen que se empregue información adicional. Neste estudo só o equipo investigador coñecerá o código que permitirá saber a súa identidade.

A normativa que rixe o tratamento de datos de persoas, outórgalle dereito a acceder aos seus datos, opoñerse, corrixilos, cancelalos, limitar o seu tratamento, restrinxir ou solicitar a supresión dos seus datos. Tamén pode solicitar unha copia dos mesmos ou que ésta sexa remitida a un terceiro (dereito de portabilidade).

Para exercer estes dereitos pode vostede dirixirse ao Delegado/a de Protección de Datos do centro a través dos medios de contacto antes indicados ou ao investigador/a principal deste estudo no enderezo electrónico: [manuel.lopez-rivadulla@usc.es](mailto:manuel.lopez-rivadulla@usc.es) e/ou tfno.: 881812205.

Así mesmo, vostede ten dereito a interpoñer unha reclamación ante a Axencia Española de Protección de Datos, cando considere que algún dos seus dereitos non foi respectado.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Poderase transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Ao rematar o estudo, e conforme á normativa, as súas mostras biolóxicas e os seus datos serán:

- *Anonimizados, e dicir, que se rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doante da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.*

Vostede poderá solicitar a destrución ou anonimización da súa mostra en calquera momento, dirixíndose ao investigador principal. Ten que saber que isto non será de aplicación aos datos resultantes dos análises que xa foran feitos.

**Existen intereses económicos neste estudo?**

Esta investigación é promovida polo grupo de investigación FORTOX con fondos aportados polo grupo de investigación FORTOX da Universidade de Santiago de Compostela.

O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.

Vd. non será retribuído por participar. É posible que dos resultados do estudo se deriven produtos comerciais ou patentes. Neste caso, Vd. non participará dos beneficios económicos orixinados.

**Como contactar co equipo investigador deste estudo?**

Vd. pode contactar con Manuel María López-Rivadulla Lamas no teléfono 881812205 ou enderezo electrónico [manuel.lopez-rivadulla@usc.es](mailto:manuel.lopez-rivadulla@usc.es).

**Moitas grazas pola súa colaboración.**

## Anexo 2:

### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Avaliación da exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en persoal sanitario.

Eu, \_\_\_\_\_

- *Lin a folha de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.*
- *Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folha de información ao participante.*
- *Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.*

Ao rematar o estudo, os DATOS/MOSTRAS, acepto que sexan:

- Eliminados
- Anonimizados para usos futuros noutras investigacións.

RESTRICCIÓN DE USO: Non autorizo a empregar a miñas mostras en investigacións que

.....

.....

Asdo.: O/a participante,

Asdo.:O/a investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

### Anexo 3

#### ANEXO III: ENTREVISTA INDIVIDUAL

Hospital:				Servicio:				
Código Trabajador:								
Edad		Sexo	M <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Fumador	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
<b>Experiencia profesional</b>								
Años de experiencia profesional total				Años experiencia profesional en puesto de trabajo actual				
Formación específica/ cursos de formación								
Puesto de trabajo/ actividad desarrollada								
Turno de trabajo								
Horas en Cabina de Seguridad Biológica (CSB)								
<b>Citostáticos manejados</b>								
Citostáticos				Nº preparaciones/día (Cantidad/día)				
<b>Gestión de Incidencias</b>								
¿Se ha producido algún derrame/salpicadura/ruptura durante el turno de trabajo?						SI	NO	
Protocolo de actuación								
<b>Uso de EPIs</b>							<b>Certificación UNE</b>	
							SI	NO
<b>Guantes</b>	Material:	Sencillo		Doble		Resistentes a QT	SI	NO
<b>Mascarilla</b>		NO		SI		Tipo:		
<b>Gafas/máscara</b>		NO		SI		Tipo:		
<b>Bata Impermeable</b>		NO		SI		Tipo:		
<b>Bata desechable</b>		NO		SI		Tipo:		
<b>Gorro</b>		NO		SI		Tipo:		
<b>Calzas</b>		NO		SI		Tipo:		
<b>Puños elásticos</b>		NO		SI		Tipo:		

QT: quimioterapia; EPIs: equipos de protección individual

## Anexo 4



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Teléfono: 881546425  
ceio@sergas.es



### DICTAMEN DEL Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

#### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 31/01/19:

Título: Evaluación de la exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en personal sanitario  
Promotor: Manuel López-Rivadulla Lamas  
Tipo de estudio: EPA SP  
Código del Promotor: MLL-GEM-2018-01  
Código de Registro: 2018/587

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIm-G de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE\*** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
Facultade de Medicina. Universidade de Santiago de Compostela	Manuel López-Rivadulla Lamas

\* Les recomendamos que revisen si la forma de contacto con el delegado de protección de datos de la institución que recogerá los datos y muestras es el que indica en la hoja de información al participante.



Documento firmado digitalmente por:  
López Vázquez, Paula: 04/02/2019 10:11  
SAOC-C4G4-BOAH-OFL8-BM15-4927-1479-602

**Y HACE CONSTAR QUE:**

1. El comité cumple los requisitos legales vigentes aplicables a los Comités de ética de investigación.
2. El comité tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del comité es:

Susana María Romero Yuste (Presidenta). Médico Especialista en Reumatología.  
Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.  
Paula M<sup>a</sup> López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.  
Belen Pérez Marcos (Vicesecretaria). Farmacéutica de Atención Especializada  
Jesús Alberdi Sudupe. Médico especialista en Psiquiatría.  
Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.  
Nuria Carballada Feijóo. Miembro lego. Representante de los intereses de los pacientes.  
Juana M<sup>a</sup> Cruz del Río. Trabajadora Social.  
Ana Belen Cruz Valiño. Licenciada en Derecho.  
Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.  
José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.  
José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.  
M<sup>a</sup> José Ferreira Díaz. Diplomada Universitaria de Enfermería.  
Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria  
Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.  
Diego Santos García. Médico Especialista en Neurología.  
Juan Vázquez Lago. Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.  
M<sup>a</sup> Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica.

En Santiago de Compostela,



Documento firmado digitalmente por:  
López Vázquez, Paula: 04/02/2019 10:11  
SACC-C.4C4-ROAH-CJPL8-BM15-492/-14/9-60Z

## Anexo 5

### FOLLA DE INFORMACIÓN AO/Á PARTICIPANTE ADULTO/A

**TÍTULO DO ESTUDO:** *Avaliación da exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en persoal sanitario*

**INVESTIGADOR:** Manuel María López-Rivadulla Lamas

**CENTRO:** Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro. Facultade de Medicina.

Este documento ten por obxecto ofrecerlle información sobre un **estudo de investigación** no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo **Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo**.

Se decide participar no mesmo, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre o mesmo. Se así o desexa, pode levar o documento, consúltalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vd. pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen obriga de dar explicacións.

#### Cal é a finalidade do estudo?

*O propósito do estudo céntrase en determinar se o persoal sanitario en contacto con axentes citostáticos se encontra exposto ós mesmos, mediante a determinación dos niveis en ouñños, antebrazos e superficies de traballo. Este estudo faise necesario para determinar o nivel de exposición dos traballadores e tomar as medidas necesarias para minimizar o risco de exposición. Determinarase a exposición a unha serie de fármacos citostáticos entre os que se inclúen: Dacarbazina, Gemcitabina, Ciclofosfamida, Metotrexato, Epirubicina, Doxorubicina, Irinotecan, Vinorelbina, Etoposído, Docetaxel, e Paclitaxel.*

#### Por que me ofrecen participar a min?

Vostede é convidado a participar porque como **paciente** se espera atopar niveis dalgún destes compostos nas mostras de ouñños, que se empregarán como mostras de control para realizar a análise das restantes mostras e para a verificación da metodoloxía de análise.

#### En que consiste a miña participación?

*A participación consistirá na obtención dunha mostra de ouñños trala administración da quimioterapia.*

*As mostras serán analizadas no Laboratorio de Toxicoloxía no Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro da Universidade de Santiago de Compostela.*

*Non se contactará co participante para obter novas mostras unha vez rematado o estudo.*

*As mostras biolóxicas recollidas someteranse a procedementos de extracción e análise para determinar a cantidade de analitos presentes.*

A súa participación terá unha duración total estimada de 0.5 horas.

*Cada participante recibirá unha folia de información na que se explicarán as características do estudo e terá que adicar tempo para ler e cubrir o consentimento informado e para a recollida da mostra.*

O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada.

#### Que molestias ou inconvenientes ten?

Os posibles riscos ou molestias estarán asociados á recollida de oruíños.

#### Obterei algún beneficio por participar?

Non se espera que Vd. obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre a *exposición a axentes citostáticos entre o persoal sanitario*. Esta información poderá ser de utilidade nun futuro para outras persoas.

#### Recibirei a información que se obteña do estudo?

Vostede non recibirá información obtida do estudo

#### Publicaranse os resultados deste estudo?

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

#### Información referente aos seus datos/mostras:

A obtención, tratamento, conservación, comunicación e cesión dos seus datos/mostras farase conforme ao disposto Regulamento Xeral de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016), a normativa española sobre protección de datos de carácter persoal vixente, a Lei 14/2007 de investigación biomédica e o RD 1716/2011.

A institución na que se desenvolve esta investigación é a responsable do tratamento dos seus datos, podendo contactar co Delegado/a de Protección de datos a través dos seguintes medios: enderezo electrónico: [manuel.lopez-rivadulla@usc.es](mailto:manuel.lopez-rivadulla@usc.es) / Tfno.: 881812205

Os datos/mostras necesarios para levar a cabo este estudo serán recollidos e conservados de modo:

- Seudonimizados (Codificados), a seudonimización é o tratamento de datos persoais de maneira tal que non poden atribuírse a un/a interesado/a sen que se empregue información adicional. Neste estudo só o equipo investigador coñecerá o código que permitirá saber a súa identidade.

A normativa que rixe o tratamento de datos de persoas, outórgalle dereito a acceder aos seus datos, opoñerse, corrixilos, cancelalos, limitar o seu tratamento, restrinxir ou solicitar a supresión dos seus datos. Tamén pode solicitar unha copia dos mesmos ou que ésta sexa remitida a un terceiro (dereito de portabilidade).

Para exercer estes dereitos pode vostede dirixirse ao Delegado/a de Protección de Datos do centro a través dos medios de contacto antes indicados ou ao investigador/a principal deste estudo no enderezo electrónico: [manuel.lopez-rivadulla@usc.es](mailto:manuel.lopez-rivadulla@usc.es) e/ou tfno.: 881812205.

Así mesmo, vostede ten dereito a interpoñer unha reclamación ante a Axencia Española de Protección de Datos, cando considere que algún dos seus dereitos non foi respectado.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Poderase transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Ao rematar o estudo, e conforme á normativa, as súas mostras biolóxicas e os seus datos serán:

- *Anonimizados, é dicir, que se rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doante da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.*

Vostede poderá solicitar a destrución ou anonimización da súa mostra en calquera momento, dirixíndose ao investigador principal. Ten que saber que isto non será de aplicación aos datos resultantes dos análises que xa foran feitos.

Existen intereses económicos neste estudo?

Esta investigación é promovida polo grupo de investigación FORTOX con fondos aportados polo grupo de investigación FORTOX da Universidade de Santiago de Compostela.

O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.

Vd. non será retribuído por participar. É posible que dos resultados do estudo se deriven produtos comerciais ou patentes. Neste caso, Vd. non participará dos beneficios económicos orixinados.

Como contactar co equipo investigador deste estudo?

Vd. pode contactar con Manuel María López-Rivadulla Lamas no teléfono 881812205 ou enderezo electrónico [manuel.lopez-rivadulla@usc.es](mailto:manuel.lopez-rivadulla@usc.es).

Moitas grazas pola súa colaboración.



## Anexo 6

### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN (PACIENTES)

TÍTULO: Avaliación da exposición profesional a quimioterápicos antineoplásicos en persoal sanitario.

- Eu, \_\_\_\_\_
- *Lin a folia de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.*
  - *Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.*
  - *Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folia de información ao participante.*
  - *Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.*

Ao rematar o estudo, os DATOS/MOSTRAS, acepto que sexan:

- Eliminados  
 Anonimizados para usos futuros noutras investigacións.

RESTRICCIÓN DE USO: Non autorizo a empregar a miñas mostras en investigacións que

.....

.....

Asdo.: O/a participante,

Asdo: O/a investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data: