

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Spinacia oleracea*,
MEDIANTE EL BIOMARCADOR DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS
EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LEÑA.**

**WILLIAN ORLANDO CASTILLO. O
DELMY LISBETH TREJO SANTACRUZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA
POPAYÁN
2007**

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Spinacia oleracea*,
MEDIANTE EL BIOMARCADOR DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS
EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LEÑA.**

**WILLIAN ORLANDO CASTILLO. O
DELMY LISBETH TREJO SANTACRUZ**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el titulo de Biólogos

Directora

NOHELIA CAJAS. S. Ph, D

Asesores

FABIO ANTONIO CABEZAS. F. Ph, D

SILVIO MARINO CARVAJAL. MSc

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN**

2007

Nota de aceptación:

Noelia Cajas. S. Ph, D. Directora de grado

Claudia Patricia Acosta, MSc
Jurado

Nilza Velasco Palomino, MSc
Jurado

DEDICATORIA

*A la memoria de mi Papá y
Mis hermanos Martín y Robín.*

Willian Orlando Castillo. O

*A Dios por darme el entendimiento y la sabiduría
A mis padres por su apoyo incondicional
A mi esposo y mi hija por su amor y comprensión
A mis hermanos y sobrinos por su cariño y ternura*

Delmy Lisbeth Trejo

Santaacruz

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por su fortaleza e inspiración en este trabajo y a nuestra familia y amigos por su incondicional apoyo.

A la universidad del Cauca, a los profesores del Dpto de Biología y en especial a los profesores y auxiliar del Énfasis en Toxicología Genética y Citogenética: Luz Stella Hoyos, Silvio Carvajal, Noelia Cajas y Elsa Betty Velasco por contribuir a la realización de este proyecto.

Al profesor Fabio Cabezas y su grupo de estudiantes en el laboratorio de química; al profesor Bernardo Ramírez, por la identificación taxonómica del material vegetal. De manera especial agradecemos el apoyo y guía de nuestra directora de grado y asesores. Igualmente hacemos extensivos nuestros agradecimientos a las profesoras de la Universidad del Cauca: Mgs Nilza Velasco Palomino, Patricia Acosta y a la Dra, Maria Elena Calderón Segura, del laboratorio de Citogenética Ambiental de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las sugerencias realizadas a nuestro trabajo de grado.

Nuestros más sinceros agradecimientos a la población del Municipio de la Unión Nariño, corregimiento de la Caldera, en especial a las mujeres en estudio, quienes hicieron posible la realización de esta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MARCO TEÓRICO	18
4.1 HUMO DE LEÑA	18
4.2 ANTIOXIDANTES Y MECANISMOS DE ACCIÓN	20
4.3 DESCRIPCION BOTANICA DE <i>Spinacia oleracea</i>	21
4.3.1 Componentes de la <i>Spinacia oleracea</i>	21
4.4 LINFOCITOS HUMANOS	22
4.5 CITOTOXICIDAD	23
4.5.1 Prueba de Índice Mitótico	23
4.6 GENOTOXICIDAD	23
4.6.1 Alteraciones Cromosómicas	23
5. ANTECEDENTES	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 POBLACION DE ESTUDIO	29
6.2 EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>SPINACIA OLERACEA</i>	29
6.3 ÍNDICE MITÓTICO	30
6.4 PRUEBA DE ANTIGENOTOXICIDAD DE <i>Spinacia oleracea</i>	31
6.4.1 Cultivo de linfocitos	31
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
6.5.1 Tipo de variables	33
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Spinacia oleracea</i>	34
7.2 CITOTOXICIDAD	34
7.2.1 Efecto citotóxico del extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i> .	34
7.3 EFECTO ANTIGENOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Spinacia oleracea</i> SOBRE LOS DAÑOS INDUCIDOS EN EL ADN, EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LEÑA.	37
7.3.1 Genotoxicidad del humo de leña	37
7.3.2 Efecto antigenotóxico de <i>Spinacia oleracea</i>	43
8. CONCLUSIONES	49
9. RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	63

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Agentes químicos y tóxicos identificados en el humo de leña	19
Tabla 2. Tipo de variables.	33
Tabla 3. Índice Mitótico registrado para el extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i>	35
Tabla 4. Categorización de los individuos en alta y baja frecuencia de Alteraciones cromosómicas	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura química de Flavonóides y betacarotenos.	22
Figura 2. Tipo de alteraciones estructurales correspondiente a cada etapa del ciclo celular.	25
Figura 3. Diagrama de extracción del extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i> .	30
Figura 4. Protocolo para cultivo de linfocitos humanos aplicado para prueba de citotoxicidad (IM) y AC.	32
Figura 5. Análisis de asociación entre el IM y la concentración del extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i> .	35
Figura 6. Análisis de asociación entre concentraciones del extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i> y las categorías de los individuos según frecuencia de AC.	39
Figura 7. Metafase aberrante en linfocitos de sangre periférica de mujer expuesta al humo de leña. Quiebre cromatídico.	40
Figura 8. Metafase aberrante en linfocitos de sangre periférica de mujer expuesta al humo de leña. Quiebre cromosómico.	40
Figura 9. Análisis de asociación entre años de exposición y frecuencia de Alteraciones cromosómicas.	41
Figura 10. Análisis de asociación entre edad y frecuencia de Alteraciones cromosómicas.	42

RESUMEN

Diferentes estudios han confirmado los efectos genotóxicos producidos por la exposición al humo de leña, un 90% de la población rural y un 30% de la población urbana en el mundo están expuestos a la combustión de biomasa (Smith, 2000); debido a esto la IARC en el 2006, clasificó al humo de leña como “probablemente carcinogénico para humanos” Grupo 2A.

A pesar de la evidencia científica y del impacto que representa el humo de leña en la salud pública mundial, pocos estudios de intervención se han llevado a cabo para reducir su toxicidad. El propósito de este estudio fue determinar *in vitro* la capacidad antigenotóxica de *Spinacia oleracea* en linfocitos de sangre periférica de 50 mujeres expuestas crónicamente al humo de leña. Estudios epidemiológicos indican que el uso de plantas con propiedades antioxidantes es un factor de protección frente al estrés oxidativo generado por factores endógenos y exógenos.

Los resultados muestran que el extracto total de *Spinacia oleracea* provee una protección significativa frente a los efectos genotóxicos generados por la exposición al humo de leña. La máxima reducción en la frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC) fue observada para la concentración 3.12mg/ml del extracto; las concentraciones restantes (0.39 y 25 mg/ml) se asemejan o no difieren del control. En el estudio no se observó una relación directa dosis-respuesta, sugiriendo que el extracto total de *Spinacia oleracea* actúa a través de diferentes mecanismos bioquímicos y a distintas dosis.

Los resultados obtenidos mediante este trabajo, se constituyen como parte esencial para los estudios de intervención humana donde se busca deducir los efectos biológicos de extractos vegetales como agentes quimiopreventivos.

Abreviaciones: **IM** Índice Mitótico, **AC** Alteraciones Cromosómicas, **chtb** Alteración cromatídica, **chrb** Alteración cromosómica, *Spinacia oleracea* Espinaca, **MN** Micronúcleos, **HAPs** Hidrocarburos aromáticos policíclicos, **RL** Radicales libres, **MP** Material particulado con diámetro menor a 10 y 2.5µm.

INTRODUCCIÓN

Está bien documentado que gran número de enfermedades humanas son el resultado de interacciones entre factores ambientales y genéticos (Au, *et al.*, 2001; Au 2003). Algunos de los más importantes agentes de riesgo son aquellos asociados a estilos de vida, alimentación, hábitos de fumar, exposición al humo de leña, combustión de motores diesel, asbestos y radón (Cortinas, 1997; López, 2000, Pandey, *et al.*, 2005).

En las comunidades agrícolas de países en desarrollo, la leña y otros combustibles sólidos son utilizados como fuente de energía para la cocción de alimentos y calefacción (Delgado J, *et al.*, 2005). Los datos sugieren que alrededor de un 90% de la población rural y un 30% de la población urbana en el mundo están expuestas a la combustión de biomasa, la cual incluye quema de leña, estiércol de ganado y residuos de cosechas (Smith, 2000).

Estudios efectuados, asocian la exposición al humo de leña con prevalencia de asma, cataratas, enfermedades pulmonares crónicas, tuberculosis, enfermedades respiratorias agudas y cáncer de pulmón, tanto en mujeres como en hombres; esto independiente de la exposición al humo de cigarrillo (Pérez, P *et al.*, 1999; Mishra, 2003; Smith 2000). Dentro de la población expuesta, los niños y las mujeres, son los más perjudicados, dado a la constante permanencia en el hogar y al oficio desempeñado en la cocina (Smith, 2000). El humo de leña contiene muchos componentes nocivos y partículas respirables en suspensión como monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, formaldehído, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), benzo-(a)-pireno, butadieno y RL considerados mutagénicos (Mishra, 2001; Oyarzún, 2004).

El modelo de la enfermedad actual presenta múltiples expresiones, por lo que ha surgido la necesidad de replantear su concepto como un proceso que se da por ciertas deficiencias nutricionales, combinadas con una predisposición genética y condiciones ambientales (Suk *et al.*, 2003). Estudios epidemiológicos indican que una alimentación con apropiado contenido de frutas y verduras son un factor de protección frente a un gran número de enfermedades crónicas y degenerativas tanto en humanos como en animales; incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, disfunción cerebral y envejecimiento prematuro (Ames *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1996; Ocké *et al.*, 1997; Mendelshon *et al.*, 1998., Tyssandier *et al.*, 2002; Riboli and Norat, 2003).

En las plantas se han encontrado micronutrientes químicos como taninos, terpenos, fenoles, fibras, vitaminas, antioxidantes, ácidos, lípidos, sustancias antimutagénicas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antiestrogénicas, los cuales modulan la defensa del organismo humano, frente a mutágenos externos capaces de interactuar con moléculas biológicas desequilibrando su función (Ames *et al.*, 1993; Pamela *et al.*, 1997; Duthie., *et al* 1996; Ferguson, 2001). Por sus propiedades terapéuticas y su marcada acción fisiológica sobre el organismo humano estas plantas se han convertido en herramienta valiosa para la medicina preventiva (Sánchez L *et al.*, 2000).

La identificación de desmutágenos y bioantimutágenos vegetales ha promovido la investigación de extractos de plantas, capaces de modificar efectos celulares adversos causados por tóxicos ambientales (Haimanti *et al.*, 1993). Dentro de esta gama de frutas y vegetales se encuentra *Spinacia oleracea*, la cual presenta capacidad antioxidante dado al alto contenido de betacarotenos, ácido ascórbico y componentes activos como flavonoides, fibras, luteína y fenoles, los cuales exhiben propiedades antioxidativas, antiproliferativas y antiinflamatorias en diversos sistemas biológicos (Guohua., *et al* 1998; Bergman M *et al.*, 2001; Lomnitski L., *et al.* 2003). Sin embargo, se hace necesario investigaciones que permitan conocer la actividad antimutagénica de *Spinacia oleracea* a nivel *in vitro*, como moduladora de daño genotóxico causado por la exposición crónica al humo de leña.

Por lo anterior se realizó este estudio, con el fin de determinar la capacidad antigenotóxica del extracto etanólico total de *Spinacia oleracea*, mediante el tratamiento *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de 50 mujeres expuestas de manera crónica al humo de leña. Esperando que las dosis del extracto total de *Spinacia oleracea* reduzcan la frecuencia de daño cromosómico, producidas por los químicos y compuestos carcinogénicos presentes en el humo de leña (Yunfei Wang *et al.*, 2003).

Para futuros trabajos es de particular interés a nivel *in vivo*, determinar como la exposición a mutágenos y la ingesta de antimutágenos interactúan a nivel de metabolismo, detoxificación y excreción.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial tanto la población rural como urbana, aún dependen de combustibles como la leña para uso doméstico. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), cerca de 3 mil millones de individuos recurren al uso de biomasa como medio energético para sus hogares. Como resultado cada año mueren por ello unos 2 millones de personas; 1,8 millones en las áreas rurales (Georgieva, 2000). Estas personas son víctimas de uno de los peligros medioambientales más letales y menos conocidos; la contaminación del aire provocada por la quema en lugares cerrados de estiércol, leña y residuos de cosechas. Dentro de este panorama mujeres y niños son los más afectados, debido a su mayor permanencia en el hogar (Smith, 2000; Pandey et al., 2005).

El Banco Mundial ha señalado esta exposición como uno de los cuatro problemas más críticos en los países en desarrollo (Mishra, 2001). Un 90% de la población rural y un 30% de la población urbana, utilizan el combustible de biomasa y el combustible fósil para la generación de energía en sus hogares (Smith, 2000). En Colombia, según el Ministerio de Ambiente y Vivienda (2006), se presentan 1.100 muertes al año por esta causa. Una publicación del Banco Mundial en agosto de 2004, señala que en Colombia se presentan anualmente 6.040 muertes causadas por contaminación atmosférica (aire exterior) y 1.100 muerte por contaminación producida en ambientes interiores, esta última asociada principalmente al humo de leña, carbón y otros combustibles sólidos utilizados como fuente primaria en la cocina (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, República de Colombia 2006). Un estudio realizado en Bogotá señala que el 50% de las enfermedades respiratorias obstructivas, están relacionadas con la exposición al humo de leña (Dennis RJ *et al.*, 1996).

El humo de leña presenta efectos desbastadores sobre la salud de las personas expuestas. La mayoría de las enfermedades y muertes ocasionadas por esta exposición, se manifiestan en infección respiratoria aguda, bronquitis crónica, tuberculosis, asma, muerte del niño antes de nacer y cáncer de pulmón (Pokhrel AK *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2005; Pandey K *et al.*, 2005; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial República de Colombia 2006).

Estudios realizados en India, Guatemala y Brasil, demuestran que la constante exposición al humo de leña, incrementa la frecuencia de mutaciones, debido a la interacción de compuestos genotóxicos generados por la combustión de

biomasa. Smith and Liu, (1993) han señalado que una exposición en la cocina durante tres horas por día, equivale a cantidades similar de benzo(a)pireno; como fumar dos paquetes de cigarrillos diario.

Paralelo a la problemática ambiental, aunque las poblaciones rurales disponen de una amplia variedad de vegetales y frutas, su inclusión en la dieta aún sigue siendo limitada, debido en parte al desconocimiento de las propiedades y beneficios para la salud que estas ofrecen. Efecto similar surge con la exposición al humo de leña donde por falta de información, la gente continúa expuesta sin dimensionar los efectos que a corto o largo plazo pueden ejercer sobre la salud. Parte de esta problemática se centra en la baja escolaridad de estas comunidades o la falta de acceso a la información que les permita vislumbrar la importancia de adoptar medidas, encaminadas a disminuir la exposición a factores de riesgo como el humo de leña. Teniendo en cuenta lo anterior es necesario la realización de estudios que permitan conocer a nivel genotóxico, los efectos causados por exposición crónica al humo de leña. De la misma manera determinar la capacidad antigenotóxica ejercido por tres concentraciones del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*.

Para la realización de este estudio participaron 50 mujeres, de una población rural del departamento de Nariño, municipio de La Unión-corregimiento de La Caldera. En esta región la leña, es el tipo de biomasa más utilizado por las amas de casa para las labores domesticas como fuente de energía para el hogar.

En función a la problemática planteada, el estudio buscó evaluar la siguiente hipótesis:

Si el extracto etanólico total de *Spinacia oleracea* tiene efecto antigenotóxico frente a los daños cromosómicos inducidos por la exposición al humo de leña, se espera que la frecuencia de Alteraciones cromosómicas (AC) sea inferior en los linfocitos tratados con el extracto, respecto de los no tratados (control); de lo contrario, la frecuencia será igual.

2. JUSTIFICACIÓN

Muchas de las enfermedades humanas son causadas por una interacción multifactorial entre agentes genéticos, ambientales y estilos de vida; razón por la cual se dice que la mayoría de las enfermedades dadas por estos factores pueden ser evitadas (Au *et al.*, 2001).

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en hombres, mujeres y niños (Ocké *et al.*, 1997). La exposición crónica a factores ambientales como el humo de leña, desencadenan diferentes afecciones como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), niños con bajo peso al nacer, enfermedades cerebro vasculares y de las vías aerodigestivas, deficiencia inmune pulmonar, infección respiratoria aguda (IRA), bronquitis crónica, autismo, neumonía intersticial crónica, hipertensión arterial, tuberculosis, muerte del niño antes de nacer, asma, fibrosis, adenocarcinomas, cataratas y cáncer (Smith, 1987; López, 2000; Bruce *et al.*, 2000; Smith, 2000; Boy, E, 2002; Kleinerman *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2004; Scheima *et al.*, 2004; Pokhrel AK *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2005; Pandey K *et al.*, 2005).

Dado al rol desempeñado en la cocina por la mujer de las áreas rurales, ella se convierte en el blanco perfecto para el desencadenamiento de diferentes patologías ocasionadas por la constante exposición al humo de leña. De hecho, se conoce que una gran proporción de mujeres expuestas han sufrido los efectos tóxicos del humo de leña desde el mismo momento de la concepción y continúa en las diferentes etapas de su vida, niña, adolescente, mujer y madre. Estudios epidemiológicos demuestran que ciertas enfermedades asociadas a dicha exposición, presentan mayor incidencia en la mujer que en el hombre (Pokhrel AK *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2005).

Los estudios toxicológicos proveen fuertes evidencias epidemiológicas, sugiriendo que la exposición al humo de leña causa efectos adversos a la salud humana, según la Organización Mundial de la Salud, 1.3 millones de muertes prematuras ocurren a nivel global, las cuales están fuertemente asociadas con la exposición al humo de leña (Luke *et al.*, 2005). Resultados de estudios en animales contribuyen al entendimiento de los posibles mecanismos en los que el humo de leña y sus partículas asociadas podrían actuar incrementando morbilidad pulmonar en individuos expuestos (Ocké *et al.*, 1997; Luke *et al.*, 2005). Según estudios toxicológicos la inhalación del humo de leña desequilibra mecanismos inmunes de defensa, importantes para mantener la resistencia frente a infecciones pulmonares

(Luke et al., 2005). El humo de leña por la mezcla genotóxica de sus partículas, causa daño o estrés oxidativo el cual se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas (Gutierrez, 2002). Teniendo en cuenta el riesgo potencial causado a la salud por el humo de leña y la suficiente evidencia de riesgo carcinogénico en animales, la IARC en el 2006 ha clasificado la exposición al humo de leña en el grupo 2A "Probablemente carcinogénico para humanos". Dejando en claro que la carcinogenicidad en animales generada por el humo de leña es mediada por mecanismos celulares similares en humanos.

Relacionado con el riesgo genético al que el hombre está siendo expuesto, la investigación actual está dirigida a la búsqueda de agentes quimiopreventivos naturales, inocuos, baratos; que provengan de fuentes dietéticas accesibles al hombre (Greenberg, 1990). Bajo este principio, los constituyentes de las plantas han cobrado importancia como agentes profilácticos. A nivel mundial se han identificado aproximadamente unas 5000 especies vegetales con posible aplicación médica, lo cual es una fracción muy pequeña del total estimado en 300000 especies (Carvajal D, *et al.*, 1991). Por lo anterior la Organización Mundial de la Salud ha insistido en que el uso de plantas con propiedades medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de salud pero, sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad para la administración en humanos (Guerrero R, 1991). En la actualidad el 75 % de la población mundial utiliza las plantas medicinales; cuyo uso tradicional se fundamenta en la planta completa (Henriques J.A *et al.*, 1991). Se conoce que los extractos totales de los vegetales ejercen en muchos casos un efecto más benéfico sobre el organismo humano, que la acción de los compuesto activos aislado (Bergman *et al.*, 2001); causando a la vez menos efectos secundarios; razonamiento que constituye el principio de la fitoterapia, de gran auge en el mundo entero (Carvajal D, *et al.*, 1991; Guerrero R. 1996).

El consumo de vegetales en la dieta diaria, ha sido reconocido desde hace mucho tiempo como fuentes de salud y vida. Dentro de este grupo *Spinacia oleracea* por sus compuestos fitoquímicos exhibe propiedades que le permitirían desempeñar funciones antioxidantes (Guohua *et al.*, 1998 y Lomnitski L *et al.*, 2003). Muchos autores han atribuido propiedades antimutagénicas, antiestrogénicas y anticarcinogénicas especialmente a los betacarotenos y flavonoides. Estos fitocompuestos tienen propiedades para inactivar moléculas excitadas electrónicamente, las cuales de no ser neutralizadas, pueden interactuar con moléculas como el ADN, ARN o proteínas, causando mutaciones y por ende inestabilidad genética (Ames, 1983; Malone, 1991, Singh and Gaby, 1991); *Spinacia oleracea* es rico en nutrientes fitoquímicos como betacarotenos, flavonoides, fenoles, luteína, vitaminas C, E y K con gran potencial antioxidante.

Diferentes estudios han sido realizados para elucidar el potencial terapéutico de los antioxidantes de *Spinacia oleracea* (Weatherby and Cheng, 1943; Zane and Wender, 1961; Aritomi and Kawasaki, 1984; Guohua *et al.*, 1998; Lomnitski, *et al.*, 2000; Nyska *et al.*, 2001; Bergman M, *et al.*, 2001, Lomnitski L, *et al.*, 2003, Nyska *et al.*, 2003). La ingesta de extractos de *Spinacia oleracea* ha sido reportada por modificar efectos celulares adversos en sujetos con cáncer de ovario (Bertone, *et al.*, 2001), cáncer de pulmón (Garcia, *et al.*, 1995), cáncer de próstata (Kotake-Nara, *et al.*, 2001), cáncer de seno (Longnecker, *et al.*, 1997; Torres-Sanchez, *et al.*, 20003) y cáncer de colón (Torres-Sanchez, *et al.*, 2000). El mecanismo de sus efectos farmacológicos no son del todo entendidos, pero estos podrían involucrar efectos directos como inhibición de la proliferación celular e interferencia con el ciclo celular (Lomnitski, *et al.*, 2003).

Por lo anterior cobra importancia la realización de estudios que permitan confirmar las propiedades antimutagénicas de *Spinacia oleracea* y conocer *in vitro* la capacidad antigenotóxica ejercida por la planta sobre los mecanismos que rigen los procesos celulares. Como lo es la activación metabólica a favor de la detoxificación y excreción de tóxicos ambientales. Sustentando a la vez bajo evidencias científicas, la habilidad de *Spinacia oleracea* como mecanismos profilácticos capaz de modular los daños causados a los cromosomas por estrés oxidativo. Así mismo se hace necesario trabajos como este, que permitan aclarar las inconsistencias existentes entre los estudios realizados. Algunos estudios epidemiológicos no soportan la hipótesis del rol protector de frutas y vegetales en la etiología de enfermedades crónicas (Renner, 1985; Blot *et al.*, 1994; Marwick, 1996). De la misma manera existen discrepancias en cuanto a las concentraciones a las que mejor actúan los betacarotenos y demás compuestos fitoquímicos presente en los extractos totales (Erdman, 1988; Sabaté and Rajaram, 2003; Kampman *et al.*, 2003).

De igual forma, dado a que no existen estudios con biomarcadores biológicos como Alteraciones cromosómicas (AC) que permitan evaluar el efecto antigenotóxico del extracto etanólico de *Spinacia oleracea* en respuesta a la exposición genotóxica generada por el humo de leña, se hace pertinente la utilización de este biomarcador de gran relevancia y potencial para detección temprana de riesgos en poblaciones expuestas. Así mismo debido a las consecuencias de la problemática causada por la exposición al humo de leña, y a la consistencia de los resultados obtenidos que soportan las propiedades antioxidantes de *Spinacia oleracea*, es primordial desarrollar campañas para que las personas la incluyan como parte esencial en la alimentación diaria y así mejorar su estilo y calidad de vida. Mediante la divulgación de los resultados obtenidos se busca motivar al diseño de programas educativos y de vigilancia epidemiológica ambiental, para que se efectúe la respectiva intervención y prevención de los problemas de salud ocasionados por dicha exposición.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Evaluar *in vitro* las propiedades antígenotóxicas del extracto etanólico total de *Spinacia oleracea*, evidenciado por la reducción de Alteraciones cromosómicas (AC) en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas al humo de leña.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener el extracto etanólico total de las hojas de *Spinacia oleracea*, mediante el método Soxhlet.
- ✓ Evaluar la posible citotoxicidad mediante Índice mitótico (IM) de 7 concentraciones del extracto etanólico total de *Spinacia oleracea* en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica, de una persona no expuesta a agentes genotóxicos.
- ✓ Determinar *in vitro* la concentración biológicamente efectiva del extracto etanólico total de *Spinacia oleracea*, que reduce la frecuencia de AC en los linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas de manera crónica al humo de leña tratados con tres concentraciones diferentes del extracto.

4. MARCO TEORICO

4.1 HUMO DE LEÑA

La exposición crónica al humo de leña actualmente se constituye en un factor de riesgo ambiental de gran impacto para la salud humana, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca de 3 mil millones de personas a nivel mundial están expuestos al uso de biomasa (Georgieva, 2000).

El nivel de exposición al humo de leña depende del nivel de emisión generado durante la reacción de combustión y de las condiciones de ventilación del área donde se está originando el proceso. La eficiencia en un proceso de combustión, depende de la cantidad suficiente de biomasa, para originar un nivel específico de calor con relación al número de partículas volátiles de la combustión producida; los más eficientes generan más calor y menos emisiones por unidad de combustible usado (Smith, 2002). La combustión de biomasa es un proceso típicamente ineficiente en el cual a través de reacciones de pirólisis, multitud de partículas y químicos orgánicos oxidados son generados (Naeher, *et al.* 2005). Rogge *et al.* (1998) ha reportado cerca de 200 compuestos orgánicos los cuales derivan de polímeros presentes en los vegetales. Durante el proceso de combustión mezclas complejas de sustancias orgánicas son emitidas lo que incluye: gases como monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno y sulfuro (NOx, y SOx), agentes metilantes, butadieno, formaldehídos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos fenólicos metoxilados, radicales libres (RL), especies iónicas, ácidos carboxílicos, carbón orgánico, carbón elemental, benzo-(a)-pirenos, compuestos orgánicos volátiles (COVs), dioxinas clorinadas, benceno, materia de partículas respirables con diámetro menor a 10µm y 2.5 µm (MP₁₀ y MP_{2.5}) capaces de atravesar y llegar a las profundidades del pulmón (Mishra, 2001; Smith, 1987; 2002, Pandey, *et al.*, 2005). Estos compuestos orgánicos presentes en el humo de leña, han resultado ser 30 veces más potentes que los extractos del humo del cigarrillo condensado utilizados en la realización de ensayos para la inducción de tumores en piel de ratón (Cupitt *et al.*, 1994). La tabla 1, resume los químicos y agentes tóxicos identificados en el humo de leña.

Aunque los estudios para conocer los efectos del humo de leña sobre el hombre ofrecen un número de ventajas epidemiológicas, estos estudios están muy limitados por razones éticas y legales. Por tanto, la mayoría de estudios realizados han sido efectuados en animales como ratones, ratas, perros y conejos; donde se ha demostrado los efectos dañinos causados al pulmón, tráquea, riñón y piel

producto de la exposición repetida a bajos niveles de humo de leña (Thorning *et al.*, 1982; Loke, *et al.*, 1984). Los escasos estudios en humanos se han realizado en bomberos y/o víctimas expuestos a la inhalación (Dubick, 2002). Es claro que el humo de leña tiene un significativo impacto sobre la salud, especialmente sobre la homeostasis pulmonar, por tanto es necesario estudios con tiempo prolongado de exposición que permitan valorar la incidencia de esta problemática y sus efectos a largo plazo.

Tabla 1. Agentes químicos y tóxicos identificados en el humo de leña.

Clase de químicos	Número de compuestos	Modo de toxicidad	Compuestos representativos *
Gases tóxicos	4+	Irritante, toxicidad aguda	Monóxido de carbono, amonio, Dioxido de nitrógeno, Dioxido de sulfuro.
COVs	30	Irritante, posible carcinógeno	Metilclorado, Metileno clorado
Hidrocarburos saturados	25+	Irritante, neurotóxico	Hexano
Hidrocarburos insaturados	40+	Irritante, carcinogénico, mutagénico.	1, 3-butadieno, Acrolein
Aromáticos monocíclicos	28+	Irritante, carcinogénico, mutagénico.	Benceno, Estireno.
HAP	20+	carcinogénico, inmunotóxico, mutagénico	Benceno(a)pireno Dibenceno(a)antraceno
Alcoholes orgánicos y ácidos	25+	Irritante, toxicidad aguda, teratogénico	Metanol, Acido acético.
Aldehídos	20+	Irritante, carcinogénico, mutagénico.	Formaldehído, Acetaldehído.
Fenoles	33+	Irritante, carcinogénico, mutagénico, teratogénico	Catecol, Cresol (metilfenoles9
Quinonas	3	Irritante, alergénico, activación redox, estrés oxidativo, respuesta inflamatoria, posible carcinogénico.	Hidroquinonas, Fluorenonas, Antraquinonas.
Radicales libres		Actividad redox, estrés oxidativo e inflamación, posible carcinógeno	Radicales tipo semi quinonas
Compuestos inorgánicos	14+	Carcinogénico, toxicidad aguda.	Arsénico, Plomo, Cromo
Materia de partículas finas		Inflamación, podría ser alergénico.	PM _{2.5}
Dioxinas clorinadas		Irritante, podría ser carcinogénico o teratogénico.	
Partículas ácidas		Irritante.	Acido sulfúrico.

* Incluidos en la lista de la EPA como contaminantes riesgosos.

Tomado de: Critical Review of the Heal Effects of Woodsmoke, 2005; pág 5.

4.2 ANTIOXIDANTES Y MECANISMO DE ACCIÓN

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas con uno o más electrones sin neutralizar, tienen una tendencia a ceder o captar electrones transformándose en moléculas muy reactivas, dirigiendo su poder mutagénico a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos causando lesiones que en la mayoría de los casos son reparadas mediante una compleja maquinaria celular. En el caso de los ácidos nucleicos, cuando el sistema de reparación falla, se producen mutaciones que pueden generar células tumorales. Los RL son producidos tanto por factores endógenos como exógenos, contribuyentes del estrés oxidativo. Estos atacan al ADN ocasionando modificaciones en su secuencia (Baher y Zehnder, 2003).

Para contrarrestar los efectos ocasionados a la salud por factores endógenos y ambientales, el consumo de frutas y vegetales rico en antioxidantes ha demostrado disminuir los niveles de daño oxidativo del ADN en linfocitos de sangre periférica (Duthie *et al.*, 1996). Un nutriente tiene propiedad antioxidante cuando es capaz de interactuar y neutralizar la acción de una molécula excitada electrónicamente, RL sin que se desestabilice (Guerra, 2001). Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias conformados por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, que a bajas concentraciones bloquean el efecto dañino de los RL. Modulan la respuesta a exposición genotóxica, impidiendo la unión covalente de compuestos carcinogénicos con macromoléculas celulares como ADN, ARN o proteínas (Smart and Zannoni, 1985, Ballester, 1996). Al mismo tiempo los antioxidantes actúan atrapando y eliminando RL mediante la formación de complejos entre mutágeno-antioxidante (Ames, 1983; Malone, 1991; Burton and Ingold, 1984; Aidoo *et al.*, 1994).

La prevención antimutagénica y anticarcinogénica ejercida por los antioxidantes sobre la salud humana, estaría dada en la etapa metabólica inhibiendo mecanismos bioquímicos; de esta forma se evitaría la activación de premutágenos a metabolitos electrofílicos, neutralizando moléculas excitadas eléctricamente mediante la estimulación de enzimas a favor de la detoxificación (De Flora and Ramel 1988; Singh and Gaby 1991). La célula posee sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares (Wolf, 1986). La catalasa, peroxisomas y la glutatión peroxidasa (GHX) y la superóxido dismutasa (SOD) que descompone O₂, son las más importantes (Romero *et al.*, 1990).

Desde hace muchas décadas un gran número de extractos y derivados de plantas capaces de modificar la actividad de mutágenos y carcinógenos han sido

identificados y evaluados en varios sistemas (Ames, 1983; Dhir, 1993; Ocke *et al.*, 1997). Los efectos de los extractos de las plantas han sido atribuidos a la interacción de sus componentes entre ellos los betacarotenos, flavonoides y el ácido ascórbico, los cuales presentan la particularidad de actuar como antioxidantes; interés que se ha generalizado como medios de prevención de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, envejecimiento prematuro y carcinogénesis química (Dhir *et al.*, 1993). De igual forma la capacidad de los antioxidantes especialmente betacarotenos para transformarse en vitamina A y actuar como antioxidantes, los convierten en un agente profiláctico a través de la dieta (Peto *et al.*, 1981; Salvadori *et al.*, 1992).

Entre las plantas que exhiben propiedades antioxidantes por su alto contenido de betacarotenos y ácido ascórbico se encuentra: la espinaca, la zanahoria, ají, remolacha, marrón, champiñones, espárrago, calabaza, acelga, brócoli, coliflor, té verde, café, tomate, frutos ácidos entre otros (Ames, 1983; Dhir, 1993; Ocke *et al.*, 1997; Lomnitski I, *et al.*, 2003).

4.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Spinacia oleracea*

Nombre genérico: ***Spinacia oleracea***

Sistemática: Reino: **Vegetal**

Clase: **Angiospermae**

Subclase: **Dicotiledónea**

Orden: **Centrospermae**

Familia: **Chenopodiaceae**

Género: ***Spinacia***

Especie: ***oleracea. L***

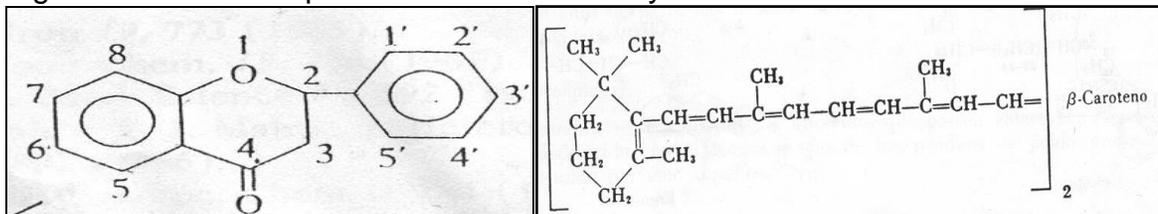
La espinaca es una planta herbácea de hojas grandes y suculentas las cuales constituyen la parte comestible. Sus pecíolos son moderadamente grandes, carnosos y turgentes resultando comestibles a la par con las hojas. Su ciclo de duración en cultivos es de dos a tres meses (Ospina, *et al.*, 1995)

4.3.1 Componentes de *Spinacia oleracea*. Se destaca como uno de los vegetales de gran trascendencia en el mundo de hoy, especialmente por su alto contenido de betacarotenos y flavonoides (figura 1), además de vitaminas A, C, K; ácidos, azúcares y fenoles. La actividad antioxidante ha sido comparada a la de otros antioxidantes conocidos encontrados como en el Té verde, mostrando ser superior en ensayos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* (Lomnitski L, *et al.*, 2003). En *Spinacia oleracea* se han identificado 13 clases de flavonoides

conocidos como methylenedioxyflavonol-glucuronides (Bergman M, *et al.*, 2001; Lomintski, *et al.*, 2003).

Mezclas de compuestos obtenidos de las hojas de *Spinacia oleracea*, han exhibido propiedad antioxidante, antiproliferativa y antiinflamatorias (Bergaman 2001; Nyska *et al.*, 2003; Lomnitski *et al.*, 2000) en sistemas biológicos. Pandjaitan *et al.*, (2005) reportó que entre los fitonutrientes encontrados en las hojas de *Spinacia oleracea*, los flavonóides presentaron la mayor contribución en la capacidad antioxidante al absorber radicales oxígeno. Breitbart, *et al.*, (2001) ha reportado su efecto protector frente al papiloma de piel, cardiotoxicidad inducida por el doxorubicín, (Nyska *et al.*, 2001) y cáncer de próstata (Nyska *et al.*, 2003), Zobel *et al.*, (1998) reportó que el extracto de *Spinacia oleracea*, redujo el daño oxidativo causado al ADN en linfocitos crío-preservados, al estimular la Glutation S transferasa P1 (GSTP1) y proteínas implicadas en la reparación del ADN. De igual forma, Edenharder *et al.*, (2003) mediante el ensayo de MN en médula ósea de ratón, encontró que el homogenizado de *Spinacia oleracea* reduce la inducción de MN por banzo(a)pireno en un 43 y 50%. Los trabajos realizados por Lomnitski *et al.*, (2003) han demostrado que los extractos acuosos de *Spinacia oleracea* no exhiben mutagenicidad en especies como ratones, ratas y conejos; exhibiendo prometedores efectos anticancerígenos en modelos experimentales con cáncer de piel y próstata.

Figura 1. Estructura química de Flavonoides y Betacarotenos.



Tomado del libro de Bioquímica de Cantarow, p 42.

4.4 LINFOCITOS HUMANOS

Los linfocitos de sangre periférica empleados como células centinelas son importantes para identificar efectos provocados por agentes genotóxicos, ya que al encontrarse en circulación en estado no proliferativo G₀, permiten observar daños acumulados por la exposición de varios años. El 90% de los linfocitos tienen un promedio de vida de aproximadamente 3 años, el 10% restante un promedio de vida de 1-10 días. Así mismo la facilidad para la obtención de muestra de sangre sin causar estrés excesivo en voluntarios asintomáticos son de gran ayuda para realizar estos análisis citogenéticos (Watt and Stephen, 1978). La relevancia de

utilizar linfocitos, radica en la posibilidad de analizar daños genéticos inducidos por diversos agentes sobre estas células, ya que estos al estar permanentemente en estado de no división (Go) acumulan daños ocasionados durante el tiempo de exposición; que se expresa al inducir división *in vitro* (Au, 1991).

4.5 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de un agente biológico, químico o físico se mide en su capacidad para alterar la morfología o fisiología celular, alterando el ciclo de la célula y en casos extremos desencadenar procesos que finalizan con la muerte celular.

4.5.1 Prueba de Índice Mitótico (IM). Es la técnica que permite determinar una sustancia con efecto bloqueador premitótico sobre todo en La fase S, fase más sensible del ciclo celular. El resultado de esta prueba permite comparar datos del grupo experimental estableciendo así si la sustancia en estudio es ciclo activa, es decir inhibe o acelera el ciclo celular (Rojas *et al.*, 1993).

4.6 GENOTOXICIDAD

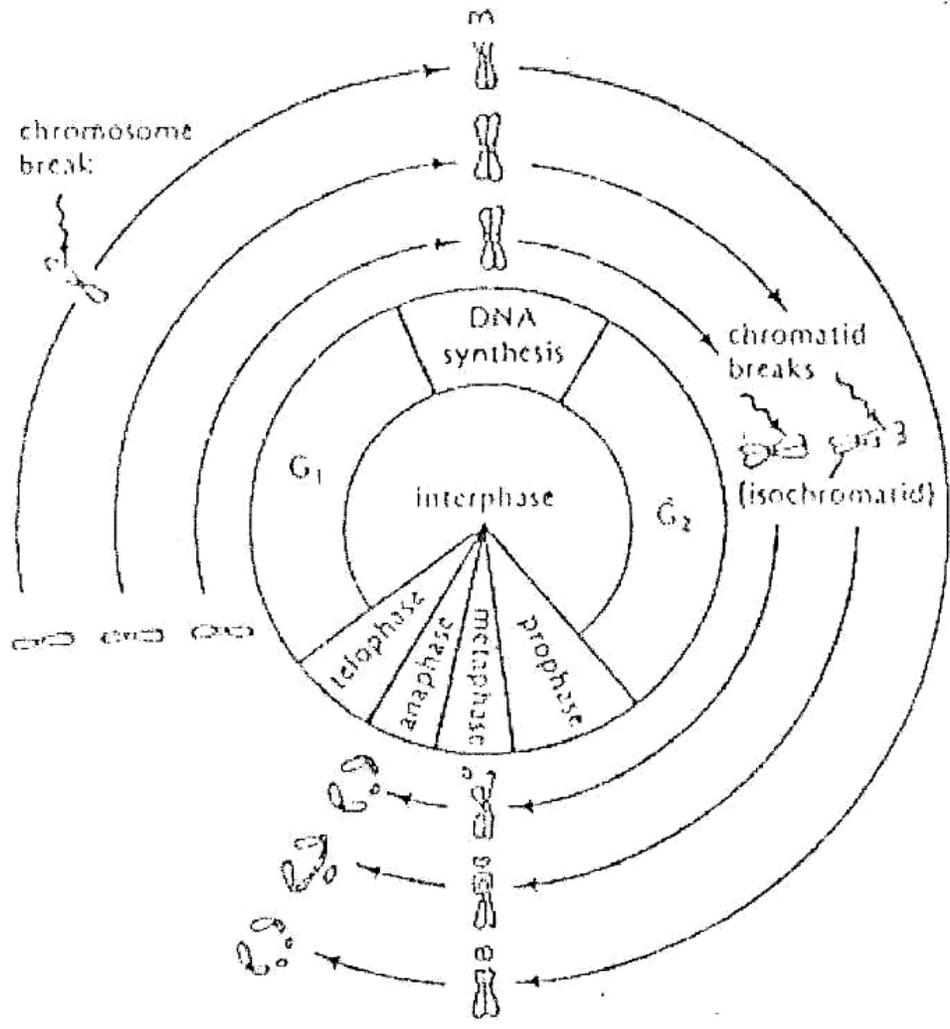
La genotoxicidad permite evaluar daños a nivel cromosómico de un gen y del genoma entero. Las alteración en el material hereditario nuclear o extranuclear en células somáticas o germinales, pueden ser producidas por agentes ambientales físicos, químicos o biológicos. La evaluación que permite estimar el daño genético puede realizarse a nivel citogenético y/o molecular. La técnica citogenética más utilizada es alteraciones cromosómicas (AC) en linfocitos de sangre periférica. Su eficacia está confirmada por un amplio número de estudios en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos (Bonassi *et al.*, 1995).

4.6.1 Alteraciones Cromosómicas (AC). La asociación existente entre AC y riesgo de cáncer, está basado sobre los conceptos de que los daños genéticos en linfocitos reflejan daños similares en células de los órganos blanco que padecen carcinogénesis (Bonassi *et al.* 2000). Las AC son biomarcadores de efecto, utilizados como dosímetro internacional para monitorear el genoma entero (Albertini, 1994; Au *et al.*, 2001). Es el biomarcador más utilizado en los estudios de poblaciones y ha mostrado buena correlación para muchos químicos, los cuales inducen daños en el ADN detectables a nivel microscópico como quiebres, arreglos cromosómicos, inserciones, deleciones y translocaciones (Albertini *et al.*, 2000). Existen diferentes factores genotóxicos que al interactuar con el material genético, alteran la regulación y expresión de los genes. Por ello las AC no sólo

son importantes como biosimétricos, sino que además de estar implicadas en la etiología del cáncer, originan inestabilidad genética transmisible y no transmisible, abortos, malformaciones, problemas reproductivos y esterilidad (Hagmar *et al.*, 1998). Su potencial como pronóstico de riesgo de cáncer, está confirmado en un estudio prospectivo de cohorte conducido en países Nórdicos y en Italia (Hagmar., *et al* 1994; Bonassi *et al.*, 1995; Hagmar *et al.*, 2004). Según Hagmar (2004) “no hay otro biomarcador para evaluar riesgo de cáncer en general, que sea aplicable a sujetos saludables de la población “.

Las AC pueden ser de tipo numérico, originadas por la no disyunción de los cromosomas durante la división celular (Evans 1982) y alteraciones de tipo estructural causada por daños en la estructura del cromosoma. Estas pueden ser de tipo cromosómico (las dos cromátidas están implicadas en el daño); originados de quiebres en la doble cadena del ADN no replicado en fase Go y G1 del ciclo celular. En las alteraciones cromatídicas (una sola cromátida está implicada en el daño) son generadas en la fase G2 del ciclo celular (Figura 2). Es así como las alteraciones cromosómicas y cromatídicas tienen mecanismos de formación diferente resultado de distintas lesiones originadas al ADN, inducidas por distintos tipos de clastógenos. A pesar de que este biomarcador es muy relevante, tiene algunas desventajas, pues muchos de los factores ambientales/ocupacionales pueden afectar e interactuar con otros agentes llegando a confundir los resultados del estudio. Por lo tanto el análisis realizado con este tipo de pruebas requiere un buen manejo de las diferentes variables (Albertini, 1999).

Figura 2. Tipos de alteraciones estructurales correspondiente a cada etapa del ciclo celular.



Tomado de IAEA, 1986.

5. ANTECEDENTES

Los problemas de salud asociados a la exposición ocupacional y ambiental, han sido reconocidos desde hace mucho tiempo por pensadores como Hipócrates, Bernardino Ramazzini, Percival Pott, Henry Earle, Volkman, Bell, Buthin entre otros (Cortinas, 1997), quienes observaron que muchas enfermedades como tumores, problemas de la piel y problemas respiratorios dependían del tipo de ocupación y tiempo de exposición al que se encontraban sometidos las personas que padecían la patología. Muchas de las cuales se tornaban agresivas en cuanto más tiempo de exposición presentaba el individuo.

Diferentes estudios han considerado la exposición a combustibles de biomasa (leña, estiércol, residuos de cosechas) y combustibles fósiles (petróleo, queroseno y gas) como responsable de distintas enfermedades de las vías respiratorias, de la piel, cardiovasculares, cerebrovasculares, artritis, asma, cáncer de cuello uterino, faringe, esófago y cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres, adultos y niños (Samet, 1987; Dennis RJ, *et al.*, 1996; Perez, P *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Smith, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Boy *et al.*, 2002; Mishra, 2003; Oyarzún, 2004; Kato *et al.*, 2004; Schei *et al.*, 2004; Delgado J, 2005; Pandey *et al.*, 2005; Pokhrel AK *et al.*, 2005).

Estudios que demuestran daño citogenético por exposición a combustibles de biomasa y combustibles fósiles, se han efectuado en países como India. En un estudio conducido por Musthapa *et al.*, (2004) utilizando los biomarcadores AC y MN, encontró que la frecuencia de daño genético para mujeres expuestas al humo de leña, decrecía en el orden: estiércol de ganado > estiércol/leña > leña > queroseno \geq petróleo líquido. De la misma manera Pandey *et al.*, (2005) mediante el ensayo Cometa en mujeres de India expuestas al humo de leña, observó alto daño de ADN, el cual se incrementaba en aquellas mujeres expuestas a combustibles como el estiércol y la leña, en comparación con aquellas que utilizaban combustible fósil (petróleo líquido). Sul *et al.*, (2003) reportó mediante el ensayo Cometa los efectos de la exposición a hidrocarburos aromáticos como el mayor inductor de daño sobre el ADN en trabajadores expuestos. Similares resultados han sido reportados por Kato *et al.*, (2004) en un estudio realizado en el Brasil en hombres expuestos al humo de leña, quienes expresaron un incremento en la mutagenicidad de metabolitos urinario resultado de la exposición al humo de leña. Dutt *et al.*, (1996) ha señalado que las mujeres expuestas al humo de leña sufren más enfermedades respiratorias y un mayor decrecimiento de las funciones pulmonares en comparación con mujeres expuestas al humo de queroseno.

La reducción de las funciones pulmonares ha sido previamente demostrada en perros expuestos al humo de leña (Stephenson, *et al.*, 1975) y en humanos víctimas de la inhalación (Garzón, *et al.*, 1970). Wong *et al.*, (1984) llegó a la conclusión, que la inhalación aguda del humo de leña puede alterar las funciones pulmonares, requiriendo para ello muchos días después de la exposición. Los resultados de estos estudios, concluyen que las inhalaciones del humo de leña pueden comprometer mecanismos inmunes de defensa pulmonar, disminuyendo así la resistencia a bacterias y otros patógenos.

Thorning *et al.*, (1982) mediante un estudio de inhalación describió los efectos producidos por el humo de leña como inductor de lesiones a las células pulmonares de conejos, determinadas por cambios en la morfología celular; y se sugirió que las partículas de aldehídos absorbidas fueron las responsables del daño. Dubick *et al.*, (2002) observó que la inhalación aguda de humo de leña produce alteraciones a nivel traqueal, resultando en una pérdida de epitelio. Así mismo alteraciones en la expresión enzimática de antioxidantes fue reportado en el mismo estudio.

El estrés oxidativo provocado por factores endógenos y agentes ambientales es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas. Para contrarrestar este daño oxidativo, diferentes estudios sobre el efecto antioxidante de frutas y vegetales han sido conducidos tanto en humanos como en animales. Dichos estudios muestran que algunos vegetales modifican y modulan efectos adversos causados al organismo previniendo así distintas enfermedades como el cáncer de pulmón, envejecimiento prematuro, enfermedades cardiovasculares y enfermedades microbianas (Dhir, 1993; Abraham *et al.*, 1986; Evans, 1993; Ziegler R. G *et al.*, 1996; Ocke *et al.*, 1997; Mendelsohn *et al.*, 1998; Nkindjocka and Ghadirian, 2004; Ferreira *et al.*, 2006; Ames *et al.*, 1993; Haimanti *et al.*, 1993; Tyssandier *et al.*, 2002; Riboli and Norat, 2003; Pamela *et al.*, 1997; Duthie *et al.*, 1996; Ferguson, 2001; Mensah *et al.*, 2006).

Spinacia oleracea, por su alto contenido de betacarotenos y otros compuestos fitoquímicos como luteína, fenoles, flavonoides, ácido-p-coumárico y vitamina C, E, K; según (Guohua *et al.*, 1998; Bergman *et al.*, 2001; Lomnitski L *et al.*, 2003) exhibe propiedades que le permiten desempeñar funciones antioxidantes capaces de modular daños ocasionados al organismo por exposición genotóxica a tóxicos ambientales.

Estudios con *Spinacia oleracea*, han sido conducidos desde 1943, cuando Weatherby and Cheng reportaron por primera vez la presencia de flavonoides. Así mismo Zane and Wender (1961) establecieron la estructura del flavonol aislado de

las hojas de *Spinacia oleracea* y describieron la presencia de espinacetina en el extracto. Por otra parte Aritomi and Kawasaki, (1984) y Aritomi *et al.*, (1986) reportaron la presencia de 7 glicósidos flavonoles en extractos metanólicos de las hojas de *Spinacia oleracea*, los cuales son considerados potentes antioxidantes. En 1997, Ferreres *et al.*, aisló e identificó 5 nuevos flavonoides en extracto alcohólico.

En el 2001, Bergman *et al.*, identificaron y describieron químicamente otros componentes antioxidantes de *Spinacia oleracea*; entre ellos derivados de flavonóides y del ácido coumárico y componentes hidrofílicos. Uno de ellos identificado como el nucleósido uridín. Además describieron dos fracciones principales; una de bajo peso molecular (1000Da) soluble en agua y otra fracción de 1000M_w insoluble; además de ácidos, aminoácidos y azúcares. En el mismo estudio fue evaluado el sinergismo de los diferentes componentes para los cuales la actividad antioxidante obtenida de la combinación de las fracciones fue el doble de la que mostraban individualmente.

Estudios previos han señalado que los componentes de *Spinacia oleracea*, poseen un sistema de antioxidantes naturales con capacidad para prevenir peroxidación de lípidos en plantas y animales tanto *in vivo* como *in vitro*. El efecto antioxidante ha sido observado al contrarrestar la peroxidación de lípidos en la piel de ratón, ratas y humanos (Grossman *et al.*, 1994; Lomnitski *et al.*, 2000). De igual forma previene daño metabólico al riñón de la rata (Zurovsky and Gispaan, 1995), además ejerce capacidad antioxidante al prevenir daños hepáticos tanto en ratas como en conejos (Ben-Shaul *et al.*, 1999; Lomnitski *et al.*, 2000). Por lo anterior los estudios con *Spinacia oleracea*, se constituye en un valioso aporte para la salud, afín de conocer su acción antígenotóxica como agente profiláctico capaz de contrarrestar el estrés oxidativo generado por diferentes agentes ambientales a la salud humana. Existe evidencia científica que soporta los beneficios de las plantas, en la prevención de enfermedades crónicas. Aunque la química de algunos compuestos fitoquímicos ha sido estudiada extensivamente; sus rutas metabólicas y funciones biológicas sólo hasta ahora comienzan a ser investigadas. Por tanto, se hace necesario sumar esfuerzos que permitan determinar como interactúan mutágenos y antimutágenos, su relación a nivel de metabolismo, detoxificación y excreción.

A través de la investigación y el aislamiento de los constituyentes de los extractos de las plantas, junto con una manipulación y selección minuciosa de nuestra dieta, pueden ser de valor potencial para reducir riesgo genotóxico en poblaciones expuestas a factores ambientales contaminados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El trabajo realizado es un estudio denominado Cuasi-experimental en mujeres residentes en el Departamento de Nariño, municipio de La Unión-corregimiento de la Caldera. La población invitada a participar en el estudio fue informada sobre los objetivos del estudio y las condiciones de su participación. Cada mujer participante fue incluida de manera voluntaria. Cada una de ellas respondió un cuestionario para determinar parámetros como edad, tiempo y condiciones de la exposición al humo de leña, tipo de alimentación (consumo de frutas y vegetales), antecedentes de enfermedades crónicas, estilos de vida y hábitos personales (consumo de alcohol, cigarrillo y drogas psicoactivas).

La participación se efectuó de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. En el estudio se incluyeron individuos con tiempo de exposición al humo de leña mayor a 10 años, consumo homogéneo de frutas y vegetales afín de evitar sesgos con el efecto antígenotóxico ejercido por *Spinacia oleracea*. Se excluyó individuos fumadores o consumidores de drogas psicoactivas, expuestos a plaguicidas, químicos genotóxicos, antecedentes de cáncer y radiaciones anteriores. Todos los individuos participaron en el estudio firmando un consentimiento informado.

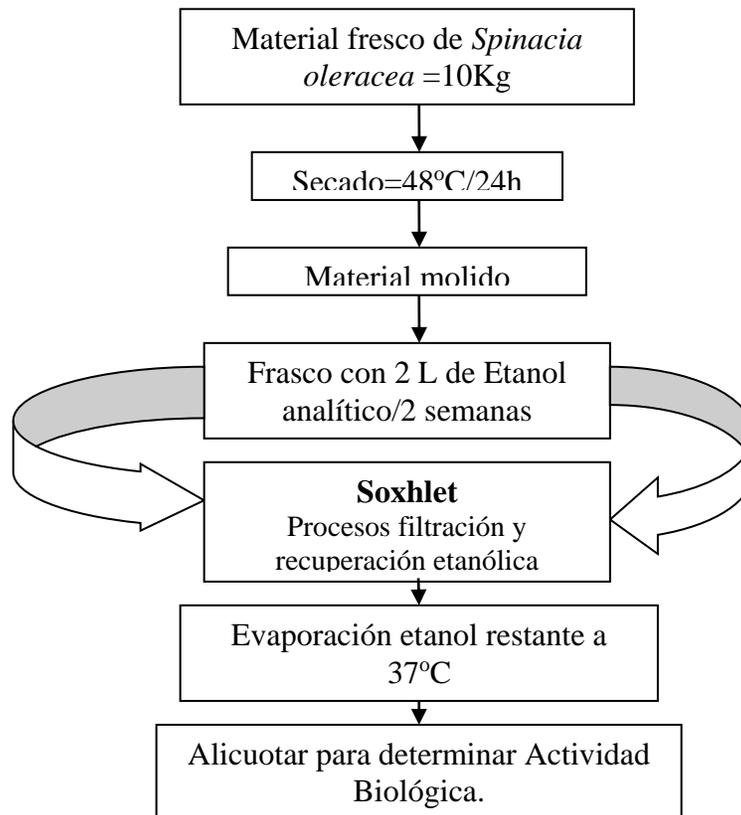
La parte experimental fue realizada en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética del departamento de Biología, acogiendo las regulaciones del Comité de ética de la Universidad del Cauca.

6. 2 EXTRACTO ETANÓLICO DE *Spinacia oleracea*

El material vegetal fue adquirido en un supermercado de la ciudad de Popayán, posteriormente fue identificado por el director del herbario de la universidad de Cauca. Las hojas frescas de *Spinacia oleracea* se pesaron (10kg), y se sometieron a proceso de secado en horno a 48°C por 24 horas, a continuación el material fue molido en molino tipo SK 100 Standard Spezst1, marca Retsch y el polvo obtenido (227.6g) se depositó en un frasco con 2L de etanol analítico por un periodo de 2 semanas; durante los cuales se realizaron procesos de filtración, recuperación etanólica y purificación por el método de arrastre de vapor Soxhlet en rotavaporador. Finalmente el extracto obtenido se llevó al horno a 37°C, con el fin

de evaporar el etanol restante. Una vez conseguido el extracto puro (6.7g) se procedió a almacenar, con el fin de realizar las respectivas diluciones. La figura 3, resume el protocolo de extracción del extracto etanólico total de *Spinacia oleracea*.

Figura 3. Diagrama de extracción del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*.



6.3 ÍNDICE MITÓTICO (IM)

La prueba de citotoxicidad (IM), se realizó en linfocitos de sangre periférica de una persona saludable, no expuesta a agentes genotóxicos o citotóxicos. Se prepararon siete diluciones con el extracto de *Spinacia oleracea* con factor de dilución de 1/2 a partir de la concentración 50 mg/ml. Las dosis evaluadas fueron: 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50 y 25mg/ml y el control (agua). El mismo experimento fue repetido tres veces.

Posteriormente se seleccionaron las tres dosis del extracto de *Spinacia oleracea*, para evaluar su capacidad antigenotóxica en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas al humo de leña. La selección se realizó así: concentración

alta, aquella que disminuyó el IM a un 20% del IM obtenido en el control (agua); concentración media la que disminuyó el IM al 50% respecto del control y concentración baja aquella que presentó un IM semejante al control. El control fue tratado con agua Miliq.

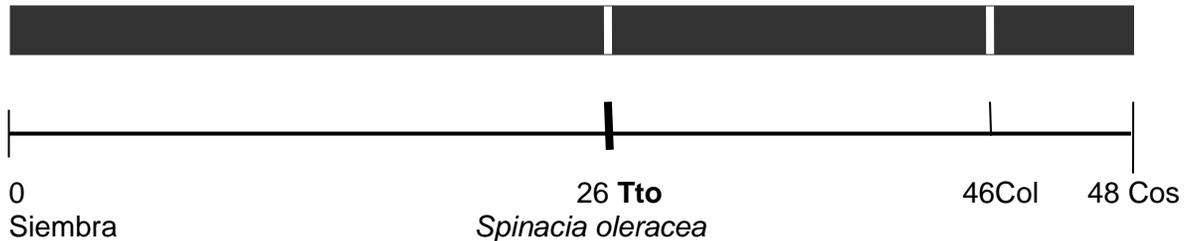
6.4 PRUEBA DE ANTIGENOTOXICIDAD DE *Spinacia oleracea*.

6.4.1 Cultivo de Linfocitos. La sangre venosa se obtuvo de cada individuo en tubo heparinizado. Por cada muestra se realizaron 4 cultivos por duplicado, según el protocolo de (Morread *et al.*, 1960), el cual fue modificado por (Carvajal *et al.*, 2002).

Las muestras de sangre se utilizaron para establecer cultivos de linfocitos siguiendo procedimientos estándar en nuestro laboratorio. A 4,5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 completo (enriquecido con suero fetal bovino al 10%, 1% de L-glutamina, 1% de antibiótico) se agregaron 0,5 mL de sangre y 0,1 mL de fitohemaglutinina, y la mezcla se incubó a 37 °C. Contadas 26 horas a partir de la siembra, se realizaron los tratamientos con las tres concentraciones del extracto total de *Spinacia oleracea*, y el control (agua). A las 46 horas, los cultivos se trataron con colcemid a una concentración final de 0,1 mg/mL, a fin de bloquear la acción del huso mitótico y obtener un buen número de células en metafase. Finalmente, los cultivos se cosecharon a las 48 horas, se centrifugaron las células para eliminar el medio de cultivo (800–1 000 rpm/7 min), se agregó solución hipotónica (0,075 M de KCl) a 37 °C durante 20 minutos y estas se fijaron con solución de Carnoy (metanol y ácido acético, 3:1). Las preparaciones citológicas se hicieron con la suspensión celular concentrada en portaobjetos limpios y mantenidos en ácido acético frío al 60%. Las placas se secaron cuidadosamente en una plancha de calor a 37 °C durante 2 minutos y después de tres días se colorearon mediante el método de coloración diferencial con tinción de Giemsa. Posteriormente las placas se montaron con Entellan, se codificaron y se sometieron a un doble enmascaramiento para evitar sesgos durante su evaluación.

Para el análisis de las AC, las placas se observaron bajo microscopio óptico a un aumento de 100X. Se analizaron 200 células con número cromosómico completo ($2n \geq 46$ cromosomas) por concentración del extracto. Se contabilizaron las AC de tipo estructural (quiebres cromatídicos, cromosómicos, dicéntricos y gaps).

Figura 4. Protocolo para cultivo de linfocitos humanos aplicado para prueba de citotoxicidad (IM) y AC.



Tto: Tratamiento; Col: Colcemid; Cos: Cosecha.

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el efecto citotóxico se evaluaron siete concentraciones *Spinacia oleracea* mas el control (agua). Este experimento se realizó tres veces; el dato final se expresó identificando 2000 células metafásicas por cultivo, con lo cual se calculó el IM mediante la siguiente formula:

$$IM = \frac{\# \text{ de metafases}}{\# \text{ total de células}}$$

Una vez calculados los IM se identificó asociación entre este IM y la concentración del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*, mediante pruebas de correlación de Spearman (no paramétrica), a fin de determinar la curva de mejor ajuste. Para la prueba antigenotóxica del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*, se evaluaron 3 concentraciones del extracto: 0.39, 3.12, 25.00mg/ml mas el control (agua), se efectuaron 4 cultivos, 2 réplicas por concentración (8 cultivos/persona) y se analizaron 100 células por réplica; 200 células por concentración. El registro de las AC se realizó mediante la tabla según modelo (ver anexos). A los datos obtenidos se les aplicó estadística descriptiva y se sometieron a prueba de significancia estadística de carácter no paramétrico (Kruskal-Wallis) y comparaciones múltiples de Duncan; todo el análisis estadístico se trabajó bajo el paquete estadístico SPSS versión 11(SPSS Inc), a un nivel de significancia máximo de 0.05.

6.5.1 Tipo de variables

Tabla 2. Tipo de variable.

V A R I A B L E S	Independiente	. Exposición al humo de leña .Concentraciones del extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i> .
	Dependiente	.IM .Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas
Factores		.Concentración del extracto etanólico de <i>Spinacia oleracea</i> .
Niveles del factor		.4 niveles: concentraciones Alta, Media, Baja y Control
Tratamientos		.4 tratamientos = 4 concentraciones
Tipo de investigación		. Cuasi - experimental
Tipo de experimento		. Comparativa o prueba de hipótesis

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Spinacia oleracea*

Se realizaron Reacciones coloridas con el fin de evaluar la presencia de algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto total de *Spinacia oleracea*. Los resultados obtenidos mediante estas pruebas arrojaron los siguientes resultados: presencia de flavanonas, flavononas y flavonoles (Prueba de Shinoda), 5-hidroxi flavonas (Prueba de Dimroth), alcaloides (Reactivo de Dragendorff), esteroides (Liebermann-Burchard) e igualmente mediante este análisis reportamos la presencia de terpenos, pues tienen el mismo precursor biogénico junto a esteroides.

7.2 CITOTOXICIDAD

7.2.1 Efecto citotóxico del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*. Se realizó la prueba de citotoxicidad (IM), en los linfocitos de una persona saludable del sexo femenino y de 35 años de edad, con el fin de identificar las tres concentraciones para la evaluación del efecto antígeno tóxico del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*.

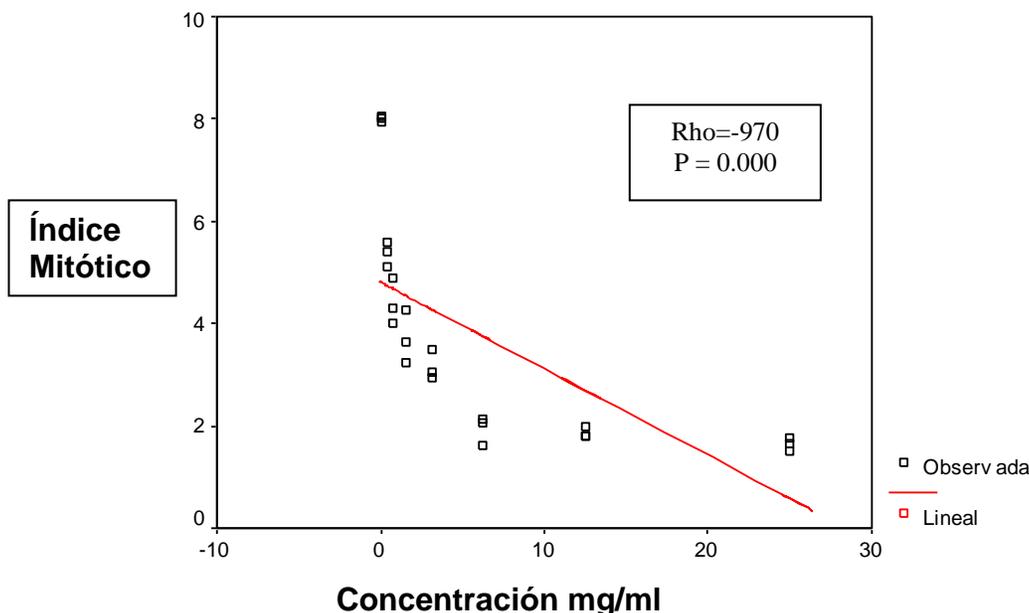
La tabla 3 resume los resultados correspondientes a la prueba de IM de las siete concentraciones (0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50 y 25mg/ml) del extracto etanólico de *Spinacia oleracea* evaluadas más el control (agua). El análisis estadístico mediante correlación de Spearman (no paramétrica), muestra una asociación negativa estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el IM y la concentración de *Spinacia oleracea*, es decir a mayor concentración del extracto menor células en división (figura 5). Esta relación de dosis-efecto (Jackson *et al.*, 1979) se presenta en las fases G1, S o G2 que genera un bloqueo en el ciclo celular, disminuyendo el número de células que pasan a la etapa de mitosis, posiblemente causado por apoptosis o muerte celular (Rojas *et al.*, 1993). Se identificó que el extracto de *Spinacia oleracea*, bloquea el ciclo celular posiblemente para permitirle a la célula reparar. Sería interesante determinar con que complejos enzimáticos del ciclo celular interactúan y en qué etapa previa a la mitosis se realiza.

Tabla 3, Índice Mitótico registrado para el extracto etanólico de *Spinacia oleracea*.

Conc. mg/ml	No. de Experimentos	X ± E E
00	3	80.00±0.288
0.39	3	53.66±1.452
0.78	3	44.00±2.645
1.56	3	37.16±2.905
3.12	3	31.66±1.691
6.25	3	19.33±1.691
12.50	3	18.66±0.666
25.00	3	16.33±0.726

X. Promedio del Índice Mitótico con su Error estándar (EE), resultado de analizar 6000 células/concentración.

Figura 5. Análisis de asociación entre el IM y la concentración del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*.



Muchos estudios realizados con extractos vegetales y sustancias que exhiben actividad antioxidante como vitaminas, han reportado un incremento de la citotoxicidad a medida que se incrementa la concentración, como se observó en nuestro estudio (figura 5) (Farine *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002, Cavalcante *et al.*, 2003). Esto debido a que niveles por encima o por debajo de los niveles fisiológicos, la conversión de estos fitonutrientes en las rutas bioquímicas es ineficiente impidiéndoles realizar funciones biológicas. Esta propiedad de algunos fitocompuestos sugiere una respuesta unidireccional, un fenómeno denominado hormesis o dosis-respuesta monotónica, la cual describe respuesta biológica con efecto positivo para sustancias cuyas concentraciones son cercanas a cero (Mushak, 2007).

Los resultados obtenidos mediante este biomarcador en la evaluación de el extracto etanólico de *Spinacia oleracea* se asemejan a los resultados del estudio de la fruta *Morinda citrifolia* L con elevado potencial antioxidante, la cual presentó bloqueo del IM sobre las células cancerosas. Pruebas adicionales mostraron que el bloqueo se debió a la inducción de necrosis a altas dosis y apoptosis a bajas dosis (Wang *et al.*, 2002). Posiblemente, el mismo efecto podría estar ocurriendo con el extracto de *Spinacia oleracea* como un mecanismo que posibilita a la célula detener el ciclo para activar mecanismos de reparación y darle tiempo a la célula que repare daños ocasionados al ADN o macromoléculas celulares.

Los hallazgos en este estudio son consistentes a los encontrados por Salvadori *et al.*, (1998) quien reportó efecto dosis respuesta para antioxidantes como los betacarotenos. Según Cavalcante *et al.*, (2003) dependiendo de las condiciones experimentales, así como rutas y tiempo de exposición los extractos con potencial antioxidante pueden ser tóxicos y/o mutagénicos. La interacción entre diferentes inhibidores mutacionales puede inducir efectos adversos incluyendo toxicidad (De Flora *et al.*, 1992). Los extractos vegetales contienen sustancias fitoquímicas como compuestos fenólicos, quercetín, ácido ascórbico y la presencia de algunos metales que en determinadas condiciones pueden actuar como agentes citotóxicos directos (Cavalcante *et al.*, 2003). Los flavonoides han sido reportados por su propiedad antitumorogénica, adicional a sus propiedades benéficas, estudios *in vitro* han indicado que la presencia de genisteína a altas concentraciones produce citotoxicidad (Ahmad *et al.*, 2004).

Según Kotake-Nara *et al.*, (2001) el uso de altas concentraciones del extracto de *Spinacia oleracea* ha demostrado potente rol citotóxico como inhibidor del crecimiento de una línea celular de cáncer de próstata, cuya propiedad estaría dada por sus componente fitoquímicos como los 5, 6 carotenóides, monoepóxidos, neoxantín y fucoxantín. Los estudios realizados con los extractos de *Spinacia oleracea* conducidos *in vivo* en especies como ratones, ratas y conejos han reportado prometedores efectos como terapia alternativa contra el cáncer al inducir efectos citotóxicos en modelos experimentales con cáncer de próstata y de piel (Lomnitski L *et al.*, 2003). La actividad quimiopreventiva ejercida por los fitonutrientes especialmente flavonóides, permitirían contrarrestar la etapa de promoción carcinogénica al inhibir la formación de los radicales de oxígeno y proteínas Kinasas que contribuyen a la regulación de la señalización intracelular. Estos mecanismos conllevarían a la prevención del desarrollo del tumor, al inducir apoptosis en las células tumorales por inhibición de la Topoisomerasa II y desregulación de p53 o causando toxicidad mitocondrial originando así apoptosis mitocondrial (Galati and O'Brien, 2004). Por otro lado Palozza *et al.*, (2002a, 2002b) ha sugerido que los betacarotenos tanto a bajas como alta dosis inducen apoptosis resultando en una modificación en la progresión del ciclo celular por decrecimiento de la expresión de ciclina A y Bcl-2. Lo anterior permite suponer que

cualquiera de los efectos mencionados pueden estar siendo ejercidos *in vitro* por el extracto etanólico total de *Spinacia oleracea* y que pueden ser los que ocasionan la disminución del IM observado.

Este trabajo es el primer estudio reportado hasta ahora, donde se utiliza un tipo de prueba citotóxica (IM) para evaluar el extracto etanólico de *Spinacia oleracea* en cultivos *in vitro* en los linfocitos de sangre periférica de una persona no expuesta a agentes genotóxicos. Para evaluar el efecto antígenotóxico de *Spinacia oleracea* sobre las AC inducidas por la exposición al humo de leña, se procedió a escoger tres de las siete concentraciones las cuales fueron: baja (0.39mg/ml), aquella que presentó un IM semejante al grupo control; media (3.12mg/ml), disminuyó el IM 50% respecto del control y alta (25 mg/ml), aquella que disminuyó el IM a un 20% en comparación al grupo control (tabla 2).

7.3 EFECTO ANTIGENOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Spinacia oleracea*, SOBRE LOS DAÑOS INDUCIDOS EN EL ADN DE MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LEÑA.

Para la evaluación antígenotóxica de *Spinacia oleracea*, se seleccionó un grupo de 50 mujeres con edades entre 22 y 47 años; con un promedio de tiempo de exposición al humo de leña de 33.54 ± 6.917 años. De extracto socioeconómico similar (medio). La estufa de leña se encontraba ubicada en un recinto cerrado y sin chimenea. Todas presentaron un consumo de frutas y vegetales bajo (una vez a la semana). Ninguna de las participantes consumía drogas psicoactivas, alcohol, cigarrillo, ni padecían de enfermedades crónicas o infecciosas, no habían estado expuestas a agentes químicos ni radiológicos. Todas participaron de forma voluntaria firmando un consentimiento informado.

7.3.1 Genotoxicidad del humo de leña. En la tabla 4 se reporta el número de alteraciones cromosómicas, alteraciones cromatídicas y alteraciones totales con el respectivo promedio (X) y error estándar (EE) registrados al analizar el efecto genotóxico generado por el humo de leña.

Teniendo en cuenta que el promedio de AC totales registrado en el control (agua) para las 50 mujeres es de 5.01 ± 0.153 (X \pm EE) se puede decir, que los resultados del presente estudio soportan la evidencia que el uso de combustibles de biomasa como la leña incrementan el daño genotóxico en los linfocitos humanos de mujeres expuestas, en comparación con la frecuencia basal 0.259 ± 0.126 A.C/ 100 células obtenida en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, en un grupo de mujeres no expuestas (Angel *et al.*, 2004).

Estos datos son consistentes con diferentes estudios epidemiológicos y de monitoreo ambiental, los cuales señalan que la constante exposición a la combustión de leña incrementa la frecuencia de daño en el ADN como AC, MN e intercambio de cromátidas hermanas (Bender *et al.*, 1988; Bolognesi *et al.*, 1997; Miichalska *et al.*, 1999, Bell y Kamens 1991). El daño genotóxico inducido al ADN es originado por diversas partículas resultado de una combustión incompleta de biomasa; la cual genera gases nocivos como HAPs, benceno, formaldehídos y material particulado con diámetro menor a 2.5 y 10µm (MP_{2.5}), (MP₁₀), conocidos por ser altamente tóxicos y carcinogénicos, capaces de provocar distintos efectos en la salud como bronquitis crónica, enfermedades pulmonares, asma y cáncer (Kerns *et al.*, 1983, Behera *et al.*, 1991; Behera y Jindal.1991; WHO.1991; Smit. 2000; Balakrishnan *et al.*, 2002). Raiyani *et al.*, (1993) demostró que la quema de estiércol produce los mayores niveles de HAPs, seguido por el humo de leña, resultados similares han sido reportados por Balakrishnan *et al.*, (2002).

Tabla 4. Categorización de los individuos en alta y baja frecuencia de Alteraciones cromosómicas.

Conc. (mg/ml)	Alta frecuencia de AC, n=29(58%)			Baja frecuencia de AC, n=21(42%)		
	chtb	chn	Totales X±EE	chtb	chr	Totales X±EE
00	4,13	1,28	5,41 ^A ±0,135	2,02	0,72	2,74 ^A ±0,206
0,39	3,35	1,03	4,39 ^{BC} ±0,077	1,82	0,71	2,53 ^A ±0,129
3,12	3,00	1,21	4,21 ^C ±0,155	1,42	0,29	1,71 ^B ±0,108
25,00	3,71	0,97	4,68 ^B ±0,097	2,37	0,42	2,79 ^A ±0,067
p	0,000	0,317	0,000	0,000	0,001	0,000

n (%): Número de mujeres en cada categoría con su respectivo promedio

X: Promedio de alteraciones cromosómicas/200 Células; EE: Error estándar

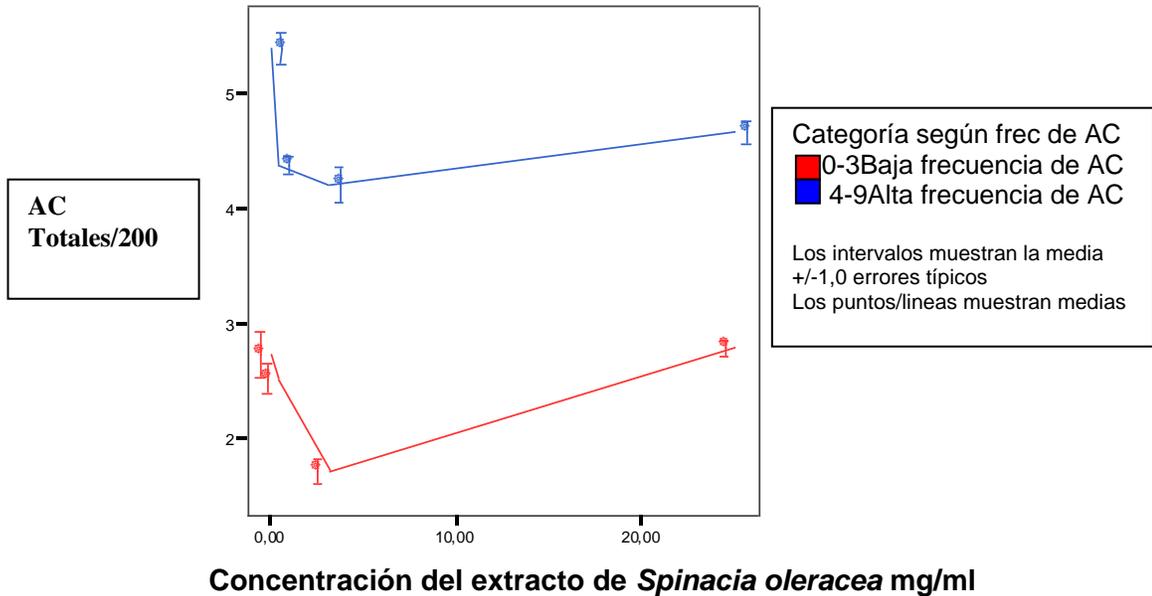
chtb: Ruptura cromatídica (chromatid break)

chr: Ruptura cromosómica (chromosome break)

A, B, C. Según prueba de comparaciones múltiples de Duncan, los promedios decrecen de A a C; promedios con las mismas letras no difieren entre si.

p= Significancia estadística mediante análisis de varianza

Figura 6. Análisis de relación entre concentraciones del extracto etanólico de *Spinacia oleracea* y las categorías de los individuos según frecuencia de AC.



Las alteraciones al DNA detectadas en este estudio fueron principalmente de tipo cromatídico (tabla 4). Teniendo en cuenta que el tipo de AC que puede producir un agente químico depende básicamente de la etapa del ciclo celular en la que se encuentran los linfocitos durante la exposición (Evans *et al.*, 1964), se asume que la elevada frecuencia de quiebres cromatídicos reportadas en esta investigación (figuras 7 y 8) podría ser causada por el efecto de los residuos de sustancias genotóxicas del humo de leña acumuladas en las células. Dicho efecto dañino se expresa en forma de alteraciones cromatídicas lo cual es el producto de un daño provocado en la fase G2 del ciclo celular (Evans *et al.*, 1964). Estos datos son consistentes a los reportados por Burgaz *et al.*, (2002) y Musthapa *et al.*, (2004) quienes observaron un incremento en el nivel de quiebres cromatídicos en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas al humo de leña. El mismo efecto ha sido reportado en otras poblaciones expuestas a diferentes tóxicos del mismo tipo al generado por el humo de leña, incluyendo policías de tránsito expuestos a altos niveles de HAPs. Warshwsky *et al.*, (1995) encontró que la exposición *in vitro* de linfocitos humanos a HAPs generado por el humo de leña, incrementa significativamente la frecuencia de MN e intercambio de cromátidas hermanas. Por otro lado Samarth *et al.*, (2006) reportó una alta frecuencia de alteraciones cromatídicas en células de médula ósea de ratón previamente expuestos a benzo(a)pireno.

Figura 7. Metafase aberrante en linfocitos de sangre periférica de mujer expuesta al humo de leña. Quiebre Cromatídico.

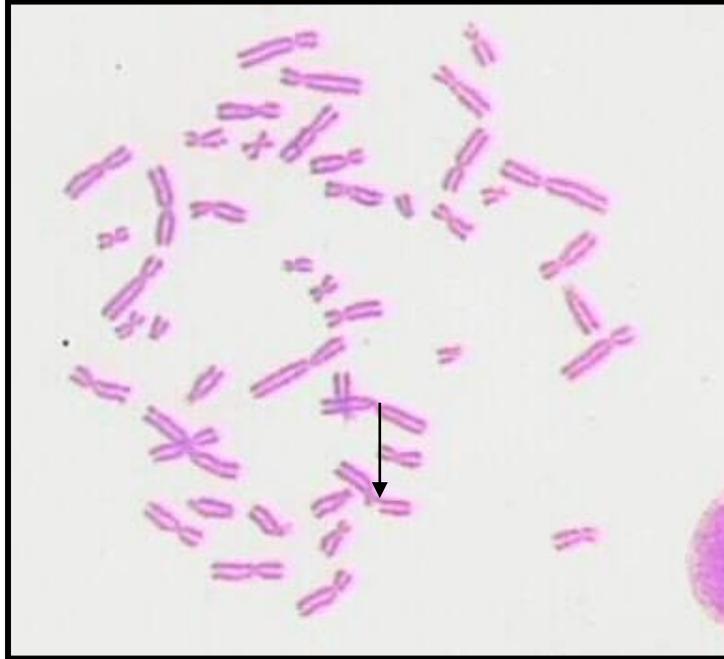


Figura 8. Metafase aberrante en linfocitos de sangre periférica de mujer expuesta al humo de leña. Quiebre Cromosómico.



En esta investigación la frecuencia de AC está asociada positivamente con el tiempo de exposición al humo de leña ($p=0.000$) (figura 9) y con la edad de las mujeres ($p=0.000$) (figura 10). El grupo de mujeres $n=29(58\%)$ categorizadas con alta frecuencia de AC y con edades y tiempo de exposición mayores a 30 años muestran significativamente ($p=0.000$) una mayor frecuencia de AC en comparación con el grupo de mujeres $n=21(42\%)$ que exhiben una baja frecuencia de AC cuya edad y tiempo de exposición al humo de leña no supera los 30 años (tabla 4). Estos resultados son consistentes a los reportados por Musthapa *et al.*,(2004) quien ha reportado mayor frecuencia de AC y MN estadísticamente significativa en el grupo de mujeres expuestas al humo de leña con edades mayor a 30 años y mayor a 10 años de exposición. En general la frecuencia de MN parece estar modulada por factores endógenos y fisiológicos de la edad (Bonassi *et al.*, 2001). Estudios previos han demostrado una asociación entre la edad y las alteraciones citogenéticas (Bolognesi *et al.*, 1997c y Bonassi *et al.*, 2001).

Figura 9. Análisis de asociación entre años de exposición y frecuencia de AC.

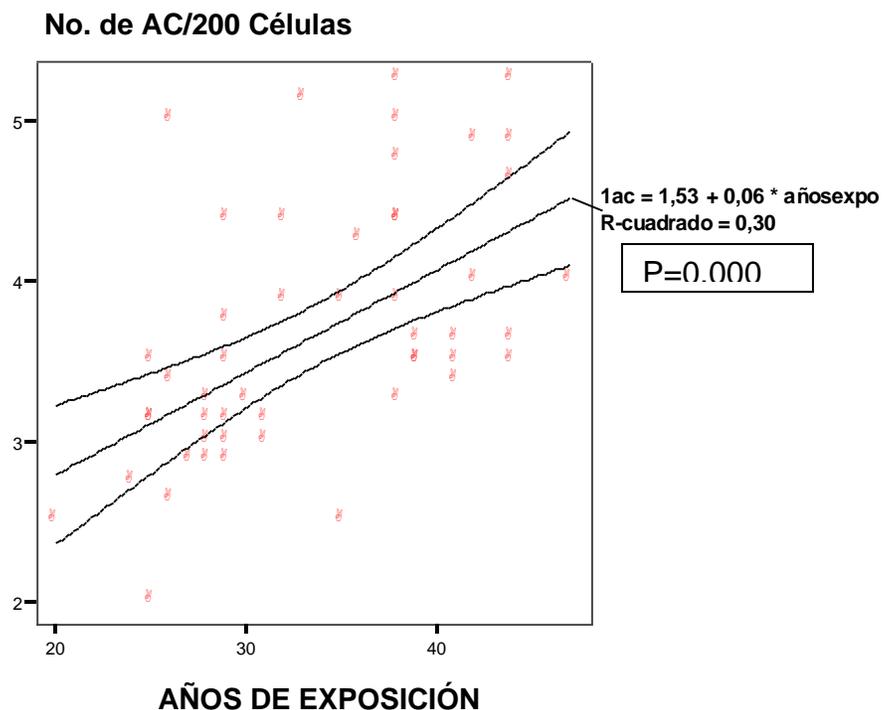
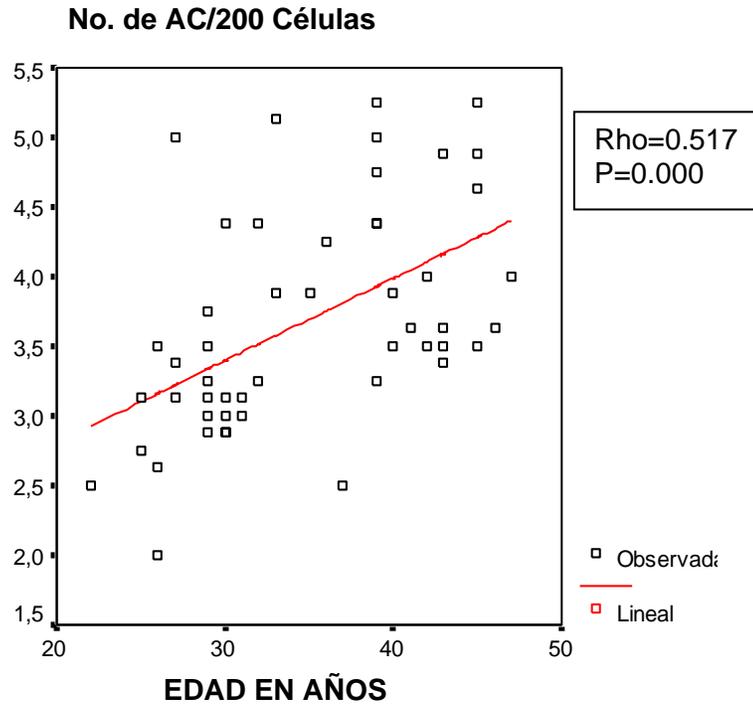


Figura 10. Análisis de asociación entre edad y frecuencia de AC.



El incremento en el daño al ADN observado, puede ser debido a la presencia de la excesiva cantidad de carcinógenos presentes en el humo de leña, como el Benceno, HAPs y formaldehídos. Una exposición constante incrementaría la frecuencia de AC indicando un efecto acumulativo de exposición (Pandey *et al.*, 2005). Los HAPs presentes en el humo de leña son iniciadores y carcinógenos completos, adicional a su mecanismo genotóxico para inducir mutaciones ellos tiene la habilidad de actuar como promotores tumorales (Baird *et al.*, 2005). La actividad promocional a nivel celular exhibida por los HAPs ha sido difícil demostrarlo *in vivo* sin embargo, al igual que los carcinógenos completos, los tratamientos repetidos sobre la piel de ratón induce la aparición de tumores (Baird *et al.*, 2005).

A nivel molecular en el metabolismo de HAPs, intervienen enzimas de la fase I, conocidas como familias del Citocromo p450 (CYPs). CYP1A1 y CYP1B1 son dos de las más importantes enzimas en la activación metabólica de HAPs, pequeñas diferencias en las secuencias de estas enzimas y otros polimorfismos genéticos pueden estar influenciando la genotoxicidad (Salama *et al.*, 2001). Muchas enzimas como la Glutathion transferasa (GST), el Uridín difosfato (UDP) glucuronosil transferasa, epóxido hidrolasa y metil transferasa además de la enzimas de la fase I contribuyen a la detoxificación de HAP, durante estas rutas de biotransformación los reactivos electrofílicos de HAPs pueden ser conjugados y excretados de la

célula. Sin embargo, algunos metabolitos de HAPs pueden aumentar su capacidad para unirse de forma covalente al ADN originando un aducto carcinógeno-ADN. La habilidad del aducto para unirse al ADN y persistir hasta formar la mutación, podría depender de la conformación del aducto entre la secuencia del ADN y la habilidad de las enzimas de reparación para identificar la lesión que podría estar intercalada entre la hélix del ADN (Wu *et al.*, 2002).

En estudios previos la inducción de AC y MN han sido ampliamente usados como biomarcadores de genotoxicidad (Fenech, 1993; Michalska *et al.*, 1999) para cuantificar efectos adversos sobre la salud humana, particularmente cáncer. Por tanto la incrementada incidencia de cáncer reportado en mujeres expuestas a combustibles de biomasa en otros países, podría entonces ser el resultado de la inestabilidad genética causada por los carcinógenos generados por el humo de leña (Lan *et al.*, 1993). He *et al.*, (1991) reportó una asociación directa entre la concentración de HAPs y cáncer de pulmón. Es así como los resultados de esta investigación y los realizados en poblaciones con elevada exposición a combustibles de biomasa (Kato *et al.*, 2004; Musthapa *et al.*, 2004 y Pandey *et al.*, 2005) podrían ayudar a explicar la alta incidencia de cáncer entre poblaciones expuestas, convirtiéndose así en herramienta relevante para conducir estudios epidemiológicos que permitan asociar niveles de daño al DNA y cáncer de pulmón.

7.3.2 Efectos antigenotóxicos de *Spinacia oleracea*. La identificación de desmutágenos y bioantimutágenos en plantas ha promovido la búsqueda de extractos vegetales capaces de modificar efectos celulares adversos causados por tóxicos ambientales (Dhir *et al.*, 1996). Los efectos protectores de extractos de plantas frente al daño oxidativo han sido atribuidos a varios componentes como: polifenoles, betacarotenos, ácidos percoumáricos, flavonoides, flavonas, fibras, vitaminas y azúcares o a una interacción sinérgica entre compuestos (Thompson and William, 1976, Abraham *et al.*, 1986; Ong *et al.*, 1986, Ferguson, 2001. Sin embargo, el uso de plantas medicinales en la medicina moderna carece en forma general de evidencia científica que soporte la habilidad para prevenir o curar enfermedades. Por tanto, es necesario proveer conocimientos sobre los mecanismos celulares involucrados en la capacidad antioxidante de extractos naturales, que justifiquen el uso de una planta o sus principios activos con propósitos clínicos (Ammon an Wahl, 1991; Sammarth. *et al.*, 2006).

En la tabla 4, se reporta el número de alteraciones cromosómicas (chrb), alteraciones cromatídicas (chtb) y alteraciones totales con el respectivo promedio y error estándar (EE) registrados al analizar el efecto antigenotóxico de *Spinacia oleracea* en los daños inducidos en el ADN por la exposición crónica al humo de leña en 50 mujeres.

Se determinó la variabilidad entre las mujeres en cuanto a tiempo de exposición y frecuencia de AC mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Walls, encontrando que hay diferencia estadísticamente significativa entre ellas ($p < 0.05$) (figura 6). Es así como se estratificó la población en dos grupos. Mujeres con un promedio de AC tan bajo como ($X \pm EE$) 2.74 ± 0.206 y tan alto como ($X \pm EE$) 5.41 ± 0.135 reportado en el tratamiento control (agua). En consecuencia para diferenciar el efecto de los tratamientos las mujeres fueron categorizadas en personas de baja y alta frecuencia de AC (tabla 4, figura 6).

Entre las mujeres con alta frecuencia de AC; las tres concentraciones del extracto etanólico de *Spinacia oleracea* redujeron significativamente ($p < 0.05$) la frecuencia total de AC respecto del control; siendo la más efectiva la concentración 3,12 mg/ml. Entre las mujeres de baja frecuencia de AC, sólo la concentración 3,12mg/ml de extracto etanólico de *Spinacia oleracea* redujo significativamente ($p < 0.05$) la frecuencia de AC respecto del control, las concentraciones restantes (0.39-25 mg/ml) se asemejan o no difieren del control (tabla 4).

En cuanto a la frecuencia de aberraciones cromatídicas, tanto en las categorías de mujeres con alta y baja frecuencia de AC se presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.000$) en el efecto antígenotóxico ejercido por las tres concentraciones respecto al control (tabla 4, figura 6). Sin embargo, para la frecuencia de aberraciones cromosómicas en la categoría de mujeres con alta frecuencia de AC, las concentraciones del extracto etanólico de la *Spinacia oleracea*, no ejercen un efecto estadísticamente significativo ($p = 0.317$) (tabla 4). Esta diferencia en cuanto a la capacidad antígenotóxica de *Spinacia oleracea* para contrarrestar efecto genotóxico de forma significativa en las mujeres con bajos niveles de AC, puede estar asociado con la edad y tiempo de exposición de las mujeres de esta categoría (tabla 4). Está demostrado que repetida exposición a HAPs incrementa riesgo para diferentes tipos de cáncer debido a la acumulación de daños producidos al ADN (Mastrangelo *et al.*, 1996). De igual forma Bolognesi *et al.*, (1997c), Bonassi *et al.*, (2001) y Musthapa *et al.*, (2004) han demostrado que la frecuencia de daño genotóxico podría estar siendo modulada por factores relacionados con la edad y el género. Mukherjee AB and Thomas (1997) encontraron una relación asociada entre edad y AC estructurales. Según López, (1998) en el transcurso de la vida gracias a un conjunto de enzimas específicas se van reparando lesiones celulares causadas por factores endógenos o ambientales que desestabilizan la célula, pero estas enzimas tienden a perder su efecto con la edad a partir de un momento característico para cada especie. Lo anterior permite inferir que en la categoría de mujeres con alta frecuencia de AC (tabla 4) las cuales presentan mayor edad y tiempo de exposición, la capacidad antígenotóxica dada por el extracto de *Spinacia oleracea*, ejerce mayor efecto sobre las alteraciones cromatídicas, pero presenta escasa modulación en las alteraciones

de tipo cromosómico, dado al mayor daño presentado en las células producto tanto de la edad como del tiempo de exposición.

Muchos de los extractos vegetales contienen sustancias que actúan como genotóxicos indirectos y agentes mutagénicos. Compuestos fenólicos incluyendo quercetín, ácido ascórbico y algunos metales presentes en el extracto podrían ejercer esa propiedad (Cavalcante *et al.*, 2003). No obstante dependiendo de las condiciones experimentales *in vivo* o *in vitro*, así como el tiempo de exposición al humo de leña, el extracto parece ser tóxico y /o comutagénico, de esta forma el extracto de *Spinacia oleracea* parece no sólo ser un recurso de compuestos antioxidantes, sino también una sumatoria de nutrientes fitoquímicos con propiedades antimutagénicas y mutagénicas. Su efecto antigenotóxico estaría dado al inducir o inactivar un sistema enzimático, resultado de una sobre exposición exógena a una sustancia genotóxica, en este caso el humo de leña. Según De Flora y Ramel (1988) la prevención de la mutagenesis por antioxidantes estaría dada en la etapa metabólica; por inhibición de los mecanismos bioquímicos responsables de la activación de premutágenos a metabolitos electrofílicos, mediante la estimulación de la detoxificación enzimática de químicos o desde los mismos mecanismos secuencialmente involucrados en los cambios de su balance a favor de la detoxificación.

El papel antimutagénico de compuestos presentes en el extracto de *Spinacia oleracea* como: betacarotenos, flavonóides y diferentes ácidos, le permitiría eliminar RL al formar complejos con una de sus dobles bandas (Burgton and Ingold, 1984). Muchos autores han atribuido el poder antimutagénico y anticarcinogénico a los betacarotenos y flavonóides dado a su capacidad para inactivar moléculas excitadas electrónicamente y estimular el sistema metabólico (Ames, 1983; Malone, 1991; Singh and Gaby, 1991; Moon *et al.*, 2006). La inhibición del daño genotóxico inducido por el humo de leña postratamientos con el extracto total de *Spinacia oleracea*, sugiere una posible interacción de los diferentes compuestos fitoquímicos con las enzimas del metabolismo, estimulando la reparación del ADN y/o la reversión del daño (De Flora, 1998; De Flora *et al.*, 2001). Los flavonóides han sido reconocidos por modular el sistema CYP450 (citocromop450) incluyendo la inducción específica de algunas isozimas y la activación o inhibición de estas enzimas (Moon *et al.*, 2006). La reducción del daño al ADN en los linfocitos expuestos a un agente genotóxico y tratados con extractos vegetales con propiedades antigenotóxicas, es debido al aumento de glutatión citosólica (GSTP1) y proteínas de reparación del ADN (Zobel *et al.*, 1998). Este aumento de enzimas citosólicas es indicativo de un incremento en la expresión de genes ejercido por los vegetales (Zobel *et al.*, 1998). Los flavonoides modulan el sistema CYP450 e inducen activación y desactivación de isoenzimas CYP; además las flavonas, flavononas e isoflavonas inhiben la actividad de aromatasas (CYP19) así decrecen la biosíntesis estrogénica y producen efectos

antiestrogénicos, importante en cáncer de seno y próstata (Moon *et al.*, 2006). La activación de enzimas de detoxificación de la fase II como UDP-glucoronil transferasa, glutathion S transferasa y quinona reductasa mediada por flavonoides resulta en la detoxificación de carcinógenos y representa un mecanismo de sus efectos anticarcinogénicos (Moon *et al.*, 2006). De igual forma antioxidantes como el ácido ascórbico bajo condiciones fisiológicas compite efectivamente con alquilación de sitios celulares nucleofílicos como ADN, ARN o proteínas, evitando que moléculas excitadas electrónicamente se unan a través de enlaces covalente (Edgar, 1974).

Nuestros resultados muestran claramente, que el extracto etanólico de *Spinacia oleracea* reduce el daño genotóxico originado por la exposición al humo de leña (tabla 4). Un efecto significativo ($p=0.000$) se observó a dosis bajas (tabla 4, figura 6), la dosis más alta evaluada no presentó actividad antígenotóxica, por lo tanto no hubo una relación dosis-respuesta. De manera consistente Salvadori *et al.*, (1992) encontró que los betacarotenos son capaces de causar un significativo decrecimiento de células con AC inducidas por ciclofosfamida y este efecto no mostró una relación directa dosis-respuesta para las concentraciones de betacarotenos evaluados. La falta de una relación dosis efecto, sugiere un fenómeno biológico. La pérdida paulatina de un efecto protector a medida que se incrementa la concentración del extracto de *Spinacia oleracea* (25mg/ml) observado en el presente estudio, podría ser debido que a niveles fisiológicos la absorción y utilización de compuestos fitoquímicos como betacarotenos y flavonoides es eficiente. Sin embargo, la conversión y absorción eficaz de betacarotenos a vitamina A decrece extremadamente a altos niveles, pues la vitamina A producto final en la ruta de conversión de los betacarotenos es la encargada de actuar biológicamente como antioxidante (Erdman, 1988), el mismo efecto podría estar siendo ejercido por flavonoides y otros nutrientes presentes en el extracto de *Spinacia oleracea*. De igual forma concentraciones (0.39mg/ml) relativamente bajas en nuestro estudio son ineficientes para que se dé una conversión bioquímica que les permita realizar actividad biológica. Yew, (1984); Aidoo *et al.*, (1994) han señalado que la absorción, distribución y utilización eficiente de antioxidantes podría comprometer condiciones fisiológicas inherentes de los animales. Si estas condiciones operan en modelos biológicos, es de esperar que condiciones similares se expresen en el ser humano para los distintos compuestos antígenotóxicos presentes en las plantas.

La antimutagenicidad del extracto de *Spinacia oleracea* fue mayor a bajas dosis (tabla 4), esta ausencia de respuesta dosis dependiente frente al daño genotóxico inducido por la exposición al humo de leña, sugiere competencia entre la actividad de algunos componentes pro y antimutagénicos, como fenoles totales, betacarotenos, flavonoides, ácidos percumáricos y vitaminas, perdiendo efecto sinérgico antígenotóxico a medida que se incrementa las concentraciones bajo

estas condiciones experimentales (Cavalcante *et al.*, 2003). Según Rao and Rao, (2007) estas observaciones sugieren una posible respuesta bifásica de los antioxidantes. Presentan actividad antioxidante y antígenotóxica cuando son ingeridos a bajas concentraciones, pero podrían tener efectos desfavorables al ser ingeridos en altas cantidades. Este fenómeno biológico denominado hormesis es un tipo de relación dosis respuesta de las cuales existen dos formas generales: dosis respuesta monotónica, la cual describe respuesta unidireccional para dosis cercanas cero y la dosis respuesta no monotónica que muestra relación bidireccional o bifásica (Mushak, 2007). El tipo de respuesta bidireccional estaría siendo ejercido por el extracto de *Spinacia oleracea* en nuestro estudio.

Estudios realizados por Cavalcante *et al.*, (2003) utilizando extracto de *Anacardium occidentale*, planta con principios antígenotóxicos, demuestran que la antimutagenicidad de dicho extracto fue mayor a bajas dosis en post tratamientos en el test de salmonella frente al peróxido de hidrógeno. En nuestra investigación la concentración que ejerce un mayor efecto antígenotóxico está dada por la concentración de 3.12mg/ml (tabla 4), lo cual permite sugerir que en condiciones *in vitro* bajo esta concentración, todos los componentes fitoquímicos encontrados en el extracto etanólico total de *Spinacia oleracea* son fisiológicamente asimilados por los linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas al humo de leña, permitiendo que haya una conversión eficiente de estos compuestos y por tanto un efecto biológico capaz de modular daño genotóxico inducido por la exposición al humo de leña, al activar o inhibir enzimas en las rutas del metabolismo implicadas en los procesos de detoxificación. Por lo tanto recomendamos realizar estudios de antígenotoxicidad en dosis más bajas o cercanas a 3.12mg/ml para determinar la dosis biológica más efectiva.

Se conoce que muchas plantas con propiedad antioxidante no sólo son un recurso de fitonutrientes sino que también contienen compuestos químicos con propiedades antioxidantes, antimutagénicas y comutagénicas (Cavalcante *et al.*, 2003). La información para evaluar efectos antimutagénicos de los antioxidantes presentes en los vegetales será un paso crítico e importante para entender su rol quimioprotector frente a sustancias carcinogénicas debido a que las condiciones complejas que ocurren *in vivo* son diferentes a las existentes en un test *in vitro*. Este estudio es de gran importancia dada la actual necesidad de identificar desmutágenos y antimutágenos naturales como una estrategia efectiva para la prevención de enfermedades de origen ambiental como el cáncer. Es de particular interés determinar los mecanismos celulares por los que la ingesta de sustancias antígenotóxicas contrarrestan los efectos de sustancias mutagénicas. De esta manera se contribuye a la generación de conocimiento sobre diferentes plantas comestibles para determinar rutas de interacción a nivel metabólico, detoxificación y excreción. La investigación minuciosa y el aislamiento de los componentes de los extractos de las plantas junto con una apropiada selección y manipulación en

nuestra dieta pueden ser de valor potencial para reducir riesgo genotóxico en poblaciones expuestas a contaminantes ambientales. Los resultados de este estudio constituye una valiosa herramienta para comparar con otros estudios el papel relevante de plantas con propiedades antioxidantes y su significancia biológica en la modulación de daño genotóxico.

Así mismo, esta investigación es el primer estudio que mide el efecto genotóxico de la exposición al humo de leña en una población de mujeres colombianas. Estos resultados deben tenerse en cuenta para la formulación de políticas encaminadas a prevenir tal exposición y evaluar las consecuencias tanto sociales, económicas como ambientales y específicamente desde el punto de vista de la salud de estas mujeres y sus futuras generaciones.

8. CONCLUSIONES

Al evaluar las siete concentraciones del extracto etanólico total de *Spinacia oleracea* mediante la prueba de citotoxicidad IM, se estableció una relación dosis-dependiente negativa, en donde la proliferación celular disminuye de manera significativa a medida que se incrementa la concentración del extracto.

Las AC detectadas en este estudio fueron principalmente de tipo cromatídico. Teniendo en cuenta que el tipo de AC que puede producir un agente químico depende básicamente de la etapa del ciclo celular, se puede deducir que el efecto genotóxico ejercido por los componentes del humo de leña están dados en la fase S tardía y/o G2 del ciclo celular.

Los resultados de este estudio demuestran claramente los efectos genotóxicos ejercidos por el humo de leña sobre las personas expuestas. Encontrándose una asociación significativa entre edad, tiempo de exposición y frecuencia de AC. Estos datos sugieren que el daño genético en mujeres de la población rural y probablemente en la población urbana podría ser reducido disminuyendo el tiempo de exposición al humo de leña.

El extracto etanólico total de *Spinacia oleracea*, tiene un efecto modulador sobre la acción de los radicales libres y demás sustancias generados por el humo de leña, reduciendo significativamente el número de AC, propiedad que le permitiría posiblemente ser utilizada como alternativa profiláctica para contrarrestar daño oxidativo.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda la realización de estudios mecanísticos adicionales que permitan evaluar en forma detallada cada uno de los compuestos de *Spinacia oleracea* a fin de determinar su actividad biológica tanto *in vivo* como *in vitro*. De igual forma mediante este estudio exploratorio se sugiere que AC podría servir como un biomarcador específico y sensitivo para trabajos que integren exposición genotóxica e inducción enzimática ejercida por extractos de plantas con propiedades antígenotóxicas.

Se sugiere la realización de estudios a nivel molecular para establecer rango de dosis biológica efectiva, ampliando rango de dosis de *Spinacia oleracea* con el fin de valorar los efectos antígenotóxicos de los antioxidantes ingeridos a través de la dieta.

Determinar el efecto de los polimorfismos genéticos asociados a la genotoxicidad del humo de leña y la propiedad antígenotóxica de *Spinacia oleracea* y otros extractos de plantas con propiedad antígenotóxica.

De igual forma la experiencia de nuestro trabajo nos permite sugerir se continúe con la evaluación de plantas, a fin de obtener un mayor conocimiento que permita utilizarlas como medidas profilácticas en la prevención de enfermedades primarias.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM SK *et al.*, inhibitory effects of dietary vegetables on the in vivo clastogenicity of cyclophosphamide. En: *Mutat Res.* 1986; 172: 51-54.

AHMAD, MD *et al.*, Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte culture. En: *Chemical Biological Int.* 2004; 107-115.

AIDOO, Anane *et al.*, Ascorbic Acid (Vitamin C) Modulates the Mutagenic Effects Produced by an Alkylating Agent In Vivo. En: *Environ Molec Mutagen.* 1994; 24: 220-228

ALBERTINI, R.J. Why use somatic mutations for human biomonitoring?. En: *Environ Molec Mutagen* 1994, 23, 24:18-22

ALBERTINI, R and ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. En: *Free Radic Res.* Mar 1999; 30(3):181-8

ALBERTINI, R, *et al.* Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in human. En: *Mutat Res.* 2000; 463:111-172

AMES, BRUCE, N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. En: *Science.* 1983; 221: 1256-1264

AMES, BRUCE, N; SHIGENAGA, M and HAGEN TORY, M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. En: *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(17):7915-7922

ANGEL P. Olga Lucia. Efecto genotóxico de la quimioterapia en mujeres con cancer de mama, evaluado mediante el biomarcador de Aberraciones Cromosómicas. Trabajo de grado para optar el título de Bióloga. Universidad del Cauca, 2006.

ARITOMI, M and KAWASAKI, T. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *spinacia oleracea* En: *Phytochemistry*, 1984; 23: 2043-2047.

-----, *et al.*, *Flavonol glycosides in leaves of Spinacia oleracea.* En: *Phytochemistry.* 1986, 25: 23-132.

AU, W.W, *et al.* Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. En: *Mutation Research*, 1991, 260:137-144

-----SALAMA. Use of Biomarkers to Elucidate Genetic Susceptibility to Cancer. En: Environ mol Mutag 2005; 45: 222-228

-----and SIERRA-Torres H. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assay. En: Environ Health Perspect 111: 2003; p 1843-1850.

----- Biomarkers monitoring for health risk based on sensitivity to environmental mutagens. En: Rev Environ Health. 2001 Jan- Mar; 16(1): 41-64

BAHER Y ZEHNDER. Bases celulares y moleculares del envejecimiento. En: ARS MÉDICA, 2003. Vol 8, No 8.

BAIRD, W M *et al.*, Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts and Mechanism of Action. En: Env Mol Mut. 2005; 45: 106-114.

BALLESTER M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. En: Med Clin (Barc) 1996; 107: 509-515.

BEN-SHAUL, V *et al.*, lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver, comparison between rat and rabbit. En: Shock; 1999, 12: 228-293.

BERGMAN, M *et al.* The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. En: Phytochemistry, 2001 Sep; 58 (1):143-52.

BLOT, WJ *et al.*, Lung cancer and vitamin supplementation. En: N Engl J Med, 1994; 331.

BOLOGNESI *et al.*, Age related increase of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in human lymphocytes. En: Cancer Epidemiol Biomarkers, 1997c; 6: 249-256.

BONASSI, Stefano *et al.*, Are Chromosome Aberrations in Circulating Lymphocytes Predictive of Futures Cancer Onset in Humans? Preliminary Results of an Italian Cohort Study. En: Cancer Genet Cytogenet. 1995; Vol. 79,133-135.

BONASSI, S and AU W.W. biomarker in molecular epidemiology studies for health risk prediction. Mutat Res. 2002. 511: 73-86.

-----*et al.* Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. En: Cancer Res, March 15, 2000; 60:1619-1625.

-----, *et al.* Human Population Studies UIT Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. En: Environ Health Perspect 2005, 45: 258-270

BOY, E; Bruce N and DELGADO, H. Birth weight and exposure to kitchen wood smoke during pregnancy in rural Guatemala. En: Environ Health Perspect, 2002 Jan; 110(1):109-14.

BOYLE, S.P *et al.* Collins AR. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. En: Eur J Nutr. 2000; Oct; 39(5):213-23.

BRUCE, N; PEREZ, Padilla R and ALBALAK, R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. En: Bull World Health Organ. 2000; 78: 1078-1092

BURTON, G.W and INGOLD, K.U. Betacarotene: An usual type of lipid antioxidant. En: Science 1984; 224: 569-573.

CAMACHO GÜELL, Luisa F, MALDONADO GÓMEZ, Darío y TORRES DUQUE, Carlos A. Rehabilitación pulmonar de la teoría a la realidad. BOLETÍN BIMESTRAL DE LA FUNDACIÓN NEUMOLÓGICA COLOMBIANA. 200: Vol 4, No2

CANTAROW ABRAHAM and SCHEPARTZ BERMARTZ. Bioquímica. 4 edición. Editorial Interamericana S.A, México D. F, 1969.

CARBAJAL D, CASACÓ A, ARRUZABALA L, GONZÁLEZ R y FUENTES V. Pharmacological screening of planta decoctions commonly used in Cuban folk medicine. J Ethnopharmacol 1991;33:21-41.

CAVALCANTE M, *et al.*, Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajúina. En: Environ Mol Mutagen. 2003; 41(5):360-9

CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética, Universidad del Cauca 2002

CORTINAS, Cristina. Cáncer: herencia y ambiente: La Ciencia para Todos. México, 1997. P11-90

CUPITT, L.T., W.G. Glen, and J. Lewtas, Exposure and risk from ambient particle-bound pollution in an airshed dominated by residential wood combustion and mobile sources. En: Environ Health Perspect, 1994. 102(S4): p. 75-84.

DAYMY PINEDA, Alonso *et al.* Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. En: Rev Cubana. Aliment Nutr 1999; 13(2):104-11.

DE FLORA, S and RAMEL. C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Clasification and overview. En: Mutat Res: 1988; 202: 285-306.

-----*et al.*, Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation –related diseases. En: Mutat Res, 2001; 480-481:9-22.

DELGADO, Javier; RAMIREZ, Alejandra y GONZALE A, Georgina. Lung Cancer Pathogenesis Associated With Word Smoke Exposure. En: Chest:g 2005; 128: 124-131

DENNIS, R.J *et al.*, Wood smoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. En: Chest. 1996 Jan; 109(1):115-119.

DHIR, Haimanti; KUMAR, Ajoy and SHARMA Archana. Relative Efficiency of Phyllanthus emblica Fruit Extract and Ascorbic Acid in Modifying Lead and Aluminium-Induced Sister- Chromatide Exchanges in Mouse Bone Marrow. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. 1993; 21: 229-236

DUBICK, M., et al., Indices of antioxidant status in rats subjected to woodsmoke inhalation and/or thermal injury. En: Toxicology, 2002. 176(1-2): p. 145-57.

DUTHIE, S.J; ROSS, M.A. and COLLINS, A.R. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. En: *Cancer Res.* 1996: 56, 1291–1295.

DUTT, *et al.*, Effect of indoor air pollution on the respiratory system of women using different fuels for cooking in an urban slum of Pondicherry. En: Natl Med J India.;9(3):113-7

EDGAR JA. Ascobic acid and biological alkylating agents. En: Nature. 1974; 248: 136-137.

EDGAR JA. Ascobic acid and biological alkylating agents. En: Nature. 1974; 248: 136-137.

EDENHARDER *et al.*, Inhibition of clastogenicity of benzo(a)pyrene ando f its trans-7, 8-gihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetable, and flavonóides. En: Mutat Res. 2003; 2: 169-181.

ERDMAN J. Jr. The physiologic chemistry of carotenes in man. En: Clin Nutr,1988; 7:101-106.

EVANS, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. En: Br Med Bull 1993; 49: 577-587.

FERRERES, F *et al.*, Acylated flavonol glycosides from spinach leaves (*Spinacia oleracea*). En: Phytochemistry, 1997, 45: 1701-1705.

FENECH M *et al.*, The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its applications to genotoxic studies in human population. En: Mutat Res, 1993; 285: 35-44

FERREIRA, A *et al.*, The invitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. En: J Ethnopharmacol. 2006; April 28; Elsevier.

FERGUSON, LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. En: Mutat Res.2001; 475(1-2):89-111

GALATI AND O'BRIEN. Potencial toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. En: Free Radic, Biol Med. 2004; 3: 287-303

GARZON, A.A., et al., Respiratory mechanics in patients with inhalation burns. En: J Trauma, 1970. 10(1): p. 57-62.

GREENBERG, ER. A clinical trial of Beta carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of the skin. N Engl J Med 1990;323:789-95.

GROSSMAN, S. *et al.*, New plant water soluble antioxidant (NAO) from spinach. En: Asada, K., Biology and medicine. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands 343-344.

GÜELL, L F; MALDONADO G, D y TORRES D, C. Rehabilitación pulmonar: de la teoría a la realidad. En: Perspectiva Neumológica. Abril 2001; 4(2)

GUERRERO, R. Editorial. En: Rev Cubana Plant Med 1996; 1(2).

GUOHUA, Cao. *et al.*, Prior Serum Antioxidant Capacity Is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Women. En: J. Nutr. 1998: 128: 2383-2390

HAGMAR, L. *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. En: Cancer Res. Jun 1994 1;54(11):2919-22.

------. Chromosomal aberration in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Stud Group on Cytogenetic Biomarkers and and health (ESCH). En: Cancer res. 1998: 58: 4117-4121

------. Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk. En: Cancer Research. March 15, 2004: 64, 2258-2263

GEORGIEVA K. [www. Ooplanet. Com/imgversn/imgversn/III/wed. html](http://www.Ooplanet.Com/imgversn/imgversn/III/wed.html).

HARMAS *et al.* Polymorphisms in DNA Repair Genes, Chromosome Aberrations, and Lung Cancer. En: Environ Mol Mutagen, 2004; 44: 74-82

HENRIQUES,J.A, MORENO, P.R, POSER, G.L, VON, C.C. Genotoxic effect of alkaloids. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991;86(Supl 2):71-4.

HIRSCH, B.A; SENTZ, K.K and McGUE M. Genetic and environmental influences on baseline SCE. En: Environ Mol Mutagen. 1992; 20(1): 2-11

HOYOS, Luz Stella; CARVAJAL Silvio M y CAJAS S, Nohelia. Manual de citogenetica : linfocitos humanos. Unicauca, 2002. p 4-5

------. Monitoreo biológico-Biomarcadores y prevención del cáncer ocupacional. Unicauca, 2002. p 1-16

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Preamble Lyon France: International Agency for Research on Cancer, 2006.

International Atomic Energy Agency (IAEA). Biological Dosimetry: Chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Vienna, 1986. Technical reports series No 260.

KAMPMAN,E. Plants foods versus compounds in carcinogenesis observational versus experimental human studies. En: Int. J. Vitan Nutr Res, 2003; 73(2)70-8.

KATO, Mina *et al.*, 2 Urinary Biomarkers in Charcoal Workers Exposed to Wood Smoke in Bahia State, Brazil Cancer. En: Epidemiology Biomarkers & Prevention June 2004 Vol. 13, 1005-1012.

Kristalina Georgieva: Disproportionate effects (Beyond 2000) 2000

KLEINERMAN, R.A. *et al.* Lung cancer and indoor exposure to coal and biomass in rural China. En: J Occup Environ Med. 2002; 44:338-344.

LOKE, J., *et al.*, Rabbit lung alter acute smoke inhalation. Cellular responses snd scanning electron microscopy. En: Arch Surg, 1982; 119(8): 956-959

LÓPEZ, Natalia. La destrucción de los seres vivos. En: Investigación y Ciencia, Biología del Envejecimiento; 1998, temas 11: 4-8.

LOMNITSKI, L *et al.* The prophylactic effects of natural water-soluble antioxidant from spinach and apocynin in a rabbit model of lipopolysaccharide-induced endotoxemia. En: Toxicol. Pathol, 2000, 28:588-600.

-----Composition, efficacy, and safety of spinach extracts. En: Nutr Cancer. 2003;46 (2):222-31.

-----*et al.*, Effects of antioxidants apocynin and the natural water-soluble antioxidant from spinach on cellular damage induced by lipopolysaccharide in the rat. En: Toxicol Pathol. 2000; (4):580-7.

LOPEZ, Juan. Cancer y medio Ambiente: Tabaco y Contaminación. 2000.

MALONE, W. F. Studies evaluating antioxidants and betacarotene as chemopreventive. En: Am J Clin Nutr. 1991; 53: 305-313.

MARWIC C. Trials reveal no benefit, possible harm of betacarotene and vitamin A for lung cancer prevention. En: JAMA, 1996; 275: 422-423

MASTRANGELO G, Fadda E, Marzia V. Polycyclic aromatic hidrocarbons and cancer in man. En: Environ Health Perspec. 1996; 104:1166-1170.

MENDELSON *et al.* Use of antioxidants supplements and its Association with Cognitive Function in a Rural Elderly Cohort. En: Am J Epidemiol, 1998 148; (1):38-44

MICHALSKA, J *et al.*, Measurements of cytogenetic endpoints in women enviromentally expomed to air pollution. En: Mutat Res, 1999; 445:139-145.

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. República de Colombia 2006.

MENSAH, AY. *Et al.*, In vitro evaluation of effects of two Ghanaian plants relevant to wound healing. En: Phytoter Res. 2006. Aug 14.

MISHRA, Vinod; RETHERFORD, R.D and SMITH, K. R. Biomass cooking fuels and prevalence of blindness in India. Journal of En: Environmental Medicine. Vol 1, Issue 4, Pages 189 – 1999.

-----, Effect of Indoor Air Pollution from Biomass Combustion on Prevalence of Asthma in the Elderly En: Environmental Health Perspectives. january 2003: Volume 111: number 1.

----- . La pobreza, salud y Medio Ambiente. 2001.

----- . "Smoke and Fires." Our Planet, Vol. 12, No. 2: 24-25.

MOON, Y J *et al.*, Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. En: *Toxicol in vitro*, 2006; 2: 287-210.

MUKHERJEE AB and Thomas. A longitudinal study of human age-related chromosomal analysis in skin fibroblasts. En: *Exp Cell Res.* 1997; 235:161-169.

MUSTHAPA, M.S *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Indian women cooking with biofuels: micronucleus and chromosomal aberration tests in peripheral blood lymphocytes. En: *Environ Mol Mutagen.* 2004; 43(4):243-9.

NAEHER, *et al.* Critica Review of the Heal Effects of Woodsmoke. Reporte preparado por Air Health Effects Division, Health Canada, Ottawa. 2005; pág 8.

NKONDJOCKA, A and GHADIRIAN, P. Dietary carotenoides and risk of colon cancer: case-control study. En: *Int J Cancer.* 2004; 110(1): 110-6.

OCKÉ *et al.* Repeated Measurements of Vegetables, Fruits, β -Carotene, and Vitamins C and E in Relation to Lung Cancer. En: *Am J Epidemiol* 1997;145;4:358-365.

ONG TM. *Et al.*, chlorophyllin: a potent antimutagen against enviromental and dietary complex mixture. En: *Mutat Res.* 1986; 173: 111-115.

OSPINA *et al.*, Enciclopedia Agropecuaria Terranova: Producción agrícola 2. Bogotá, Terranova Editores, Ltda., 1995 (2): 290.

OYARZÚN G, Manuel. AVANCES EN ASMA BRONQUIAL: Factores ambientales relacionados con la gravedad del asma. En: *Rev Chil Enf Respir.* 2004; 20: 25-29.

PAIVA S and RUSSELL R. Beta caroteneand other carotenoida as antioxidants. En: *J Am Coll,Nutr.*1999; 18: 426-23

PAMELA L, H; MERRILE M and BRITT M, L. Diet and risk of salivary gland cancer. En: *Am J Epidemiol* 1997; 142 (2): 172-176

PETO, R *et al.* Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? En: *Nature* 1981; 290: 201-208

PANDEY ALOK, K *et al.*, DNA Damage in Lymphocytes of Rural Indian Women Exposed to Biomass Fuel Smoke as Assed by the Comet Asay. En: *Environ Mol Mutagen.* 2005; 45: 435-441

PEREZ PADILLA, J. R; REGALADO PINEDA, J and MORAN MENDOZA, A.O. The domestic inhalation of the smoke from fire wood and of other biological materials. A risk for the development of respiratory diseases. En: Gac Med Mex. Jan-Feb 1999; 135 (1):19-29

POKHREL, A.K *et al.* Case-control study of indoor cooking smoke exposure and cataract in Nepal and India. En: Int J Epidemiol. Jun 2005; 34(3):702-708

RENNER HW. Anticlastogenic effect of Betacarotene in Chinese hamsters. Time and dose response studies with different mutagens. En: Mutat Res. 1995; 144: 251-256.

RIBOLI, Elio and NORAT, Teresa. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. En: American Journal of Clinical Nutrition, Sep 2003: Vol. 78, No. 3, 559S-569S

ROGGE, W.F., *et al.*, Sources of fine organic aerosol. 9. Pine, oak and synthetic log combustion in residential fireplaces. En: Environmental Science and Technology, 1998. 32(1): p. 13-22.

ROJAS, E *et al.*, Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. En: anti-cancer Drugs. 1993: Vol 4: 637-640.

ROMERO-ALVIRA D, *et al.* Importancia de los antioxidantes en la alimentación humana En: Med Clin (Bar) 1990; 94: 69-75.

SABATE, J and RAJARAM, S. Role of fruit and vegetables in the etiology of cancer. En: American Jour of Clinical Nutrition, 2003; Vol. 78, No. 3, 559S-569S

SALAMA, SA *et al.*, Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo(a)pyrene. En: Environ Mol Mutagen, 2001; 37: 17-26.

SALVADORI, Daisy M.F, *et al.* Beta-Carotene as Modulator of Chromosomal Aberrations Induced in Mouse Bone Marrow Cells. En: Environ Mol Mutagen. 1992; 20: 206-210

SAMARTH, R.M; PANGWAR Meenaskshi and KUMAR Ashok. Modulatory Effects of Mentha piperita on Lung Tumor Incidence, Genotoxicity, and Oxidative Stress in Benzo (a) pyrene-Treated Swiss Albino Mice. En Environ Mol Mutagen. 2006; 47:192-198

SAMET J M; MARBURY, M C and SPENGLER J D. Health effects and sources of indoor air pollution (Part I & 2). En: Am Rev Respir Dis 1987; 136: 1486-508

SANCHEZ LAMAR, A *et al.* Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. En: Rev Cubana Farm 2000; 34(1): 34-43

SCHEI, M.A *et al.* Childhood asthma and indoor woodsmoke from cooking in Guatemala. En: J Expo Anal Environ Epidemiol. 2004;14 Suppl 1:S110-117.

SHARMA A. effects of metals on chromosomes of higher organism. En: Environ Mutagen. 1984; 9: 19 –226.

SHOYAB. M. Inhibition of the binding of 7, 12- dimethylbenz(a)anthracene to DNA of murine epidermal cell in culture by vitamin A and vitamin C. En: Oncology. 1981; 38: 187-192.

SINGH, V. N and GABY, S. K. Premalignant lesions: Role of antioxidant vitamins and betacarotene in risk reduction and prevention of malignant transformation. En Am J Clin Nutr. 1991; 53: 386-390.

SMART, R.C and ZANNONI, V.G. Effect of ascorbate on covalent binding of benzene and phenol metabolites to isolated tissue preparations. En: Toxicol Appl Pharmacol. 1985; 77: 334-343

SMITH, K.R. Biofuels, air pollution and health: a global review. New York. Plenum 1987: 476.

----- . National burden of disease in India from indoor air pollution. En: Proc Natl Acad Sci U S A. November 21 2000: 97(24): 13286–13293.

----- . Indoor air pollution in developing countries: recommendations for research. En: Indoor Air. 2002: 12(3):198-207.

STEPHENSON, S.F., *et al.*, The pathophysiology of smoke inhalation injury. En: Ann Surg, 1975. 182(5): p. 652-60.

SUK , W.A; MURRAY, K; AVAKIAN, M.D. Environmental hazards to children's health in the modern world. En: Mutation Research 2003 (544):235-242.

SUL, *et al.* (DNA damage in T- and B-lymphocytes and granulocytes in emission inspection and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons: En: Mutat Res, 2003; 538(1-2):109-19

THORNING, D.R., *et al.*, Pulmonary responses to smoke inhalation: morphologic changes in rabbits exposed to pine woodsmoke. En: Hum Pathol, 1982. 13(4): p. 355-64.

TYSSANDIER, C, Nicolas *et al.* Vegetable-borne lutein, lycopene, and β -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. En: American Journal of Clinical Nutrition. , March 2002: Vol. 75, No. 3, 526-534

VAINIO, H. Promise of molecular epidemiology epidemiologic reasoning, biological rationale and risk assessment. En: Scand J Work Environ Health. 1999 (6):498-504.

VALKONEN, M and Kuusi T. Vitamin C prevents the acute atherogenic effects of passive smoking. En: Free Radic Biol Med. Feb 1, 2000: 28(3):428-36.

WATT, J.L and STEPHEN, G.S. Human Cytogenetic a practical approach: Lymphocytes culture for chromosome analysis. Edited by D E Rooney & B H Czepulkowski, Oxford, 1978: 39-42

www.botanical-online.com

WANG,Y *et al.* From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity DNA repair, 2003; 2: 901-908

WEATHERBY, L, and CHENG. L. Determination of the flavons or quercetin like substances in certain naturally occurring products En: J. Biol. 1943; chem. 48-707.

WOLFF SP, GARNER A, Dean RT. Free radicals, lipids and protein degradation. En:Trends Biochem Sci 1986;11: 27-31.

WONG, K.L., *et al.*, Evaluation of the pulmonary effects of woodsmoke in guinea pigs by repeated CO₂ challenges. En: Toxicol Appl Pharmacol, 1984. 75(1): 69-80.
WU, M *et al.*,. Relatin repair susceptibility of carcinogen-dmage DNA with structural distortion and thermodynamic stability. En: Nucle Acid Res, 2002; 30:3422-3432.

ZANE, A, and WENDER, S.H. Flavonols in spinach leaves. En: J. Org, 1961, chem. 26, 4718.

ZIEGLER, R.G; MAYNE, S.T and SWANSON, C.A. En: Nutrition and Lung Cancer. Cancer Causes Control. 1996: 7, 157-177.

ZOBEL, *et al.*, En: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1998; 10:891-899.

ZUROBSKY, Y, *et al.*, unilateral renal ischemia reperfusion in the rat: effect of blood volume trapped in the kidney, sucrose infusion, and antioxidant treatments. En: Exp. Toxicol. Pathol.1995; 47, 471-478,

ANEXOS A
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA

código

--	--	--	--

Fecha _____ Dirección _____ Teléfono _____

Nombre _____ Edad (años cumplidos) _____

Tipo de cocina: con ventilación _____ sin ventilación _____

Numero de años expuesto al humo de leña _____ Horas/día _____

Fuma cigarrillo Si _____ No _____ Consumo de alcohol Si _____ No _____

Tiene exposición a químicos en general Si _____ No _____

Ha tenido enfermedades que han requerido hospitalización Si _____ No _____

Enfermedad _____ Tratamiento _____

Enfermedad _____ Tratamiento _____

Ha sido irradiada Si _____ No _____

En su familia hay antecedentes de cáncer? Si _____ No _____

Tipo de cáncer _____

ALIMENTACIÓN

VECES POR SEMANA

Verduras Sí _____ No _____ _____

Carnes Sí _____ No _____ _____

Frutas Sí _____ No _____ _____

Legumbres Sí _____ No _____ _____

ANEXO B

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ identificada con cedula de ciudadanía No. _____

Certifico que se me ha pedido que participe como sujeto en una investigación llamada "Evaluación *in vitro* del extracto etanólico de *spinacia oleracea*, mediante el biomarcador de aberraciones cromosómicas en mujeres expuestas al humo de leña", bajo la dirección de la Dra. Noelia Cajas Salazar de la Universidad del Cauca, Popayán.

PROPÓSITO: Evaluar *in vitro* las propiedades antioxidantes del extracto etanólico de *Spinacia oleracea*, mediante el biomarcador de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas de manera crónica al humo de leña.

El beneficio a la sociedad será la información obtenida acerca de la relación entre efecto antioxidante de la *Spinacia oleracea* y la capacidad para contrarrestar daño genotóxico en población expuestas ambientalmente.

PROCEDIMIENTOS: Si decido participar en el estudio, una vez haya firmado el consentimiento informado, entiendo que completaré un cuestionario sobre estilo de vida y estado de salud. Si califico para participar en el estudio, yo donaré voluntariamente una muestra de sangre de aprox. 10 ml. obtenidos de la vena de mi brazo, para extracción del material genético (ADN). Todas las muestras serán tomadas por profesionales calificados.

NUMERO DE PARTICIPANTES: El número aproximado será de 30 mujeres.

BENEFICIOS AL SUJETO: Entiendo que no recibiré beneficio directo por mi participación voluntaria en este estudio. Los datos del estudio serán confidenciales sus conclusiones solo serán extrapolados a la población.

RIESGOS POR PARTICIPACIÓN: Entiendo que como riesgos potenciales de mi participación en este estudio son sangrado o infección en los sitios de toma de muestras, los cuales serán evitados mediante el uso de técnicas asépticas por personal clínico calificado y experimentado.

CONFIDENCIALIDAD: Entiendo que la información del cuestionario y todas las muestras serán identificadas con un código para proteger mi nombre y datos personales. Esta información será mantenida bajo estricta confidencialidad por parte de los investigadores (William Orlando Castillo y Lisbeth Trejo Santacruz).

CLAUSULAS ESTANDAR: Entiendo que el consentimiento voluntario es requerido para todas las personas en este proyecto. Los procedimientos principales, han sido expuestos y me los han explicado en un lenguaje que yo puedo entender. Me han explicado los riesgos e incomodidades de los procedimientos. Me han explicado los beneficios de este estudio. Me han ofrecido responder a todas las preguntas que yo pueda tener acerca de los procedimientos antes de ingresar al estudio. Si tengo una pregunta durante o después del procedimiento puedo contactar al Dra Noelia Cajas Salazar Tel. 8209872. Me han dicho que la Universidad del Cauca no tiene mecanismos de compensación si algún daño físico ocurriera como resultado ajeno a esta investigación en los sujetos de investigación. Sin embargo, entiendo que tratamientos de emergencia disponibles para el público en general están disponibles para mi también. Yo tengo el derecho a la privacidad y confidencialidad de toda la información obtenida con relación a este estudio. La información obtenida de este estudio que pueda identificarme será sólo conocida por el investigador principal, quien podrá tener acceso a mi historia clínica si es necesario. Los resultados de este estudio pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales ó ser publicados en revistas científicas sin identificarme por mi nombre.

Las muestras tomadas solo serán utilizadas para investigación en este estudio.

Acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en el proyecto antes mencionado. Entiendo que se me dará una copia de este consentimiento.

Fecha

Firma del sujeto

Testigo

Usando un lenguaje apropiado y comprensible he discutido este proyecto y los puntos anteriores con el sujeto y su representante autorizado o con ambos.

Fecha

Firma del Director del Proyecto

