

**EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA
AL HUMO DE BIOMASA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN
CÉLULAS DE LOS EPITELIOS BUCAL Y NASAL, EN UN GRUPO DE
MUJERES EXPUESTAS PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS
AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, CAUCA**

**MARÍA MERCEDES RAMÍREZ DE VALDENEBRO
ELIZABETH CRISTINA ORDÓÑEZ PAZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2014**

EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE BIOMASA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE LOS EPITELIOS BUCAL Y NASAL, EN UN GRUPO DE MUJERES EXPUESTAS PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, CAUCA

**MARÍA MERCEDES RAMÍREZ DE VALDENEBRO
ELIZABETH CRISTINA ORDÓÑEZ PAZ**

**Trabajo de grado
para optar al título de Biólogo**

**Director
Nohelia Cajas Salazar Ph.D.**

**Asesor
Silvio Marino Carvajal Varona Mg.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2014**

Nota de Aceptación

Director _____

Nohelia Cajas Salazar Ph.D.

Jurado _____

Sulma Lilian Muñoz Benítez Ph.D.

Jurado _____

Diana Milena Muñoz solarte Mg.

Fecha de sustentación: Popayán, ____ de _____ del 2014

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la luz que guía mi camino y mi fortaleza en los momentos más difíciles. A las personas más importantes en mi vida, mi familia, quienes siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo y amor. A quienes con su apoyo y compañía, me dieron fuerza para continuar y finalizar esta importante etapa en mi vida y dar inicio a muchos más.

"Creo fielmente en que un día no se vive sino te ríes."

Agradezco a mi padre Daniel Antonio Ordóñez Flor y a mi Madre María Rubiela Paz Muñoz por su apoyo incondicional en cada momento, por los valores que me han inculcado y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. A mi hermano Javier Ordóñez y Yohana Ordóñez, por ser parte importante de mi vida y llenarla de alegría y amor cuando más lo he necesitado. A mis amigos y compañeros de universidad por todos los momentos que pasamos y las enseñanzas que cada uno dejo en mí. Un agradecimiento muy especial a Mónica tejada, Victoria Ortega, Diego Imbachí, Marco Fidel Mosquera Ramírez y Carlos Durán por su apoyo y ayuda durante el desarrollo de este trabajo de grado, gracias por creer y confiar en esta loca idea que al final fue una realidad.

Elizabeth Cristina Ordóñez Paz

En memora de la amada y siempre bella tía abuela Rosita y de mi inmortal y adorado amigo Rafael...a ellos dedico este logro... hasta reencontrarnos en algún lugar sobre el arcoíris...

A mis valientes y perseverantes padres María Rosa y Jaime Alberto, esto es para ellos, eternamente...

A mi compañero de vida Julio Alberto desde mis más profundos afectos...

Con mis más sinceros sentires...

Mil gracias a mis amados padres por ser el timón de mi vida, por confiar en mí, por su infinito y entero amor, por su apoyo incondicional en cada instante de mi vida y por su inmenso esfuerzo en todos estos años por darme todo para ser una mejor persona; gracias a mi compañero de vida por ser mi motor y por su imprescindible presencia y ayuda en este paso de mi vida; a mis hermanas y sobrino por acompañarme y apoyarme en los momentos más difíciles, a todos mis amigos del alma y compañeros gracias por su complicidad y por compartir conmigo pedazos de sus vidas,

María Mercedes Ramírez de Valdenebro

AGRADECIMIENTOS

A todas las mujeres que hicieron parte de los grupos de estudio, quienes fueron el pilar y la razón de ser de este trabajo.

A todos aquellos que nos donaron muestras durante el proceso de estandarización, sin ellos no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

A Jhon Carlos Meléndez Y Lyda Patricia Mosquera por brindarnos su conocimiento con la mayor generosidad y calidez, por darnos la mano en los momentos más oportunos, a ellos nuestros sentidos y estimados agradecimientos.

A Albeiro Polanco por abrirnos las puertas, por compartirsu valioso tiempo y conocimiento con nosotras,por su amabilidad, perseverancia y entusiasmo en cada uno y todos los momentos en que requerimos su ayuda.

A nuestra directoral Dra. Nohelia Cajas Salazar, por toda su paciencia, dedicación y esfuerzo, porexigirnos al máximo para dar lo mejor de nosotras para llegar a ser profesionales íntegras y competitivas.

A nuestro asesor Mg Silvio Marino Carvajal Varona, por guiarnos tan certeramente y hacerlo con el cariño y paciencia que lo caracteriza, por mantener sus puertas abiertas en todo momento.

A la Dra. Luz Stella Hoyos, por permitirnos hacer parte del Énfasis de Toxicología Genética y Citogenética, por facilitarnos las condiciones para realizar este trabajo y por sembrar en nosotras las bases del conocimiento con el cual logramos dar vida a esta obra científica.

A las integrantes del Grupo de Investigación Toxicología Genética y Citogenética, por colaborarnos con amabilidad, cariño y gentileza.

A Elsa Betty Velazco por su fortaleza y entereza, por ser nuestra compañera fiel en todo momento y acompañarnos desde el principio hasta el final de este logro.

A Victoria Ortega por ayudarnos incondicionalmente en las etapas más difíciles de este proyecto y hacerlo con el aprecio y dulzura de siempre.

A todos nuestros amigos y compañeros por brindarnos su apoyo incondicional, alegrías y buenos momentos, con quienes aprendimos el valor de la amistad y emprendimos un camino juntos, a ellos gracias por perdurar en la distancia y en el tiempo (Carolina Jiménez, Gilmar Delgado, Jennifer Astudillo, Karina Burbano, Zaida Collazos, Liseth Bolaños, Fabián Martínez, Fidel Mosquera, Mónica Tejada, Diego Imbachí, Diana Velazco, Ana Isabel Zúñiga, Carlos Durán, Cristian Velarde, Karen Meneses, Robinson Jiménez, Dayana Galindez, Victoria Ortega, Juliana Salazar, Brian Latorre).

A la Universidad del Cauca y todos los profesores que contribuyeron en nuestra formación científica y personal, por enseñarnos el valor de nuestra carrera y sembrarnos metas y sueños.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. PROBLEMÁTICA	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. ANTECEDENTES	21
5. MARCO TEÓRICO	25
5.1 TOXICIDAD DEL HUMO DE LEÑA	25
5.1.1 Componentes del humo de leña	25
5.1.2 Metabolismo de algunos compuestos del humo de leña	26
5.2 REPARACIÓN DEL ADN	28
5.3 BIOMARCADORES	29
5.3.1 Biomarcadores de efecto temprano	29
5.3.2 Biomarcadores de exposición	29
5.3.3 Biomarcadores de susceptibilidad.....	29
5.4 MONITOREO GENETICO	29
5.5 DETERMINANTES SOCIALES DE LAS SALUD (DSS)	30
5.6 ENSAYO CITÓMICO	30
5.6.1 Biomarcadores de genotoxicidad.....	30
5.6.1.1 Micronúcleos (MN).....	30
5.6.1.2 Brotes nucleares (BrN).....	31
5.6.2 Biomarcadores de citotoxicidad.....	31
5.6.2.1 Células binucleadas (BN).....	31
5.6.2.2 Células tri-polinucleadas (TN-PN).....	31
5.6.3 Biomarcadores de muerte celular.....	31
5.6.3.1 Células con cromatina condensada (Cc)	31
5.6.3.2 Células cariorrécticas (Cr).....	32
5.6.3.3 Células picnóticas (Pn)	32
5.6.3.4 Células cariolíticas (Cl)	32
5.6.4 Índice de reparación (IR).....	33
5.7 TEJIDO EPITELIAL	34
5.7.1 Epitelio nasal.....	34
5.7.2 Epitelio bucal.....	35

6. METODOLOGÍA	37
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	37
6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	37
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.	37
6.4 RECOLECCIÓN DE DATOS.....	37
6.5 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS Y OTRAS ANOMALÍAS NUCLEARES	38
6.5.1 Obtención de las muestras.....	39
6.5.2 Procesamiento de las muestras y tinción.....	39
6.5.3 Conteo y registro de biomarcadores.....	39
6.6 MANEJO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
6.7 SOCIALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	41
7. RESULTADOS	42
7.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	42
7.2 CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN E INFRAESTRUCTURA DE LA COCINA.....	43
7.3 COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO Y ENTRE LOS EPITELIOS NASAL Y BUCAL	44
7.3.1 Comparación entre los grupos de estudio.....	44
7.3.2 Comparación entre los epitelios nasal y bucal.....	45
7.4 FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES EN RELACIÓN A LA EDAD, TIEMPO DE EXPOSICIÓN, TIPO DE HORNILLA, UBICACIÓN Y VENTILACIÓN DE LA COCINA.....	46
7.5 FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES EN RELACIÓN A LA INTERACCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA INFRAESTRUCTURA DE LA COCINA.....	50
7.6 EFECTO DE LA DIETA SOBRE LAS FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES DE LOS EPITELIOS NASAL Y BUCAL	51
7.7 CORRELACIONES ENTRE LOS BIOMARCADORES EN EL GRUPO EXPUESTO	53
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	68
10. RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	82

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.....	43
Tabla 2. Características de la exposición e infraestructura de la cocina	44
Tabla 3. Comparación de las frecuencias de los biomarcadores entre el grupo referente y el grupo expuesto.....	45
Tabla 4. Comparación de las frecuencias de biomarcadores entre los epitelios nasal y bucal..	46
Tabla 5. Frecuencias de los biomarcadores en relación a la edad, tiempo de exposición, tipo de hornilla, ubicación y ventilación de la cocina en el epitelio nasal.....	47
Tabla 6. Frecuencias de los biomarcadores en relación a la edad, tiempo de exposición, tipo de hornilla, ubicación y ventilación de la cocina en el epitelio bucal.....	48
Tabla 7. Efecto de la dieta sobre las frecuencias de los biomarcadores de los epitelios nasal y bucal.....	52
Tabla 8. Correlaciones entre los biomarcadores en el grupo expuesto	53

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Estudios citogenéticos en humanos de evaluaciones ambientales y ocupacionales mediante el Ensayo de Micronúcleos y otras anomalías nucleares en células del epitelio nasal y bucal, realizados entre los años 1991 y 2014.....	23
Cuadro 2. IARC evaluaciones de los compuestos presentes en las emisiones de la combustión de leña o carbón.....	26
Cuadro 3. Descripción de las variables analizadas en la población de estudio.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metabolismo y mecanismo de acción del B[a]P	27
Figura 2. Mecanismo de reparación del ADN por extremos no homólogos (NHEJ).....	28
Figura 3. Biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad evaluados en células columnares del epitelio respiratorio pseudoestratificado nasal	32
Figura 4. Biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad y muerte celular evaluados en células escamosas diferenciadas del epitelio bucal.....	33
Figura 5. Modelo citómico bucal donde se muestra las relaciones celulares y los eventos de una célula basal a su posterior diferenciación, muerte celular y diferentes tipos de daño genético que pueden ocurrir	33
Figure 6. Anatomía e histología de las cavidades nasal y bucal.	35
Figura 7. Células basales y diferenciadas de los epitelios nasal y bucal	36

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Correlación de la frecuencia de MN con la edad de las mujeres de los grupos de estudio y de BN con el tiempo de exposición al humo de leña en el epitelio nasal y bucal.....	49
Gráfica 2. Interacción entre las características de la infraestructura de la cocina y su influencia en algunos biomarcadores.....	50

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Origen de los MN a partir de cromosomas enteros y fragmentos acéntricos de cromosomas en una célula en división..... ¡Error! Marcador no definido.	82
Anexo 2. Proceso apoptótico de las células columnares ciliadas del epitelio respiratorio nasal pseudoestratificado	82
Anexo 3. Encuesta realizada a la población de estudio.....	83
Anexo 4. Consentimiento Informado.....	85
Anexo 5. Registro del proyecto ante la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca.....	88
Anexo 6. Aval Ético otorgado por Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca.....	90
Anexo 7. Formato de Registro de los biomarcadores evaluados.	91
Anexo 8. Células de la cavidad nasal.....	92
Anexo 9. Campos donde se muestras células escamosas del epitelio bucal y células columnares ciliadas del epitelio nasal.....	92
Anexo 10. Fotos de células nasales normales y con anomalías nucleares reportadas en los estudios que emplean el epitelio nasal.....	92
Anexo 11. Tinciones empleadas en el epitelio bucal.	93
Anexo 12. Ubicación de las cocinas en la vivienda.....	94
Anexo 13. Ventilación de las cocinas.....	95
Anexo 14. Tipos de hornillas.....	96
Anexo 15. Características de la vivienda que modulan la exposición.....	97
Anexo 16. Exposición ocupacional al humo de leña.....	97

RESUMEN

Nuestro objetivo fue investigar los efectos adversos de la exposición ambiental al humo de leña sobre los epitelios nasal y bucal en mujeres expuestas pertenecientes a tres veredas del municipio de Popayán y dos veredas del municipio de Timbío del departamento del Cauca. 70 mujeres fueron seleccionadas para formar el grupo expuesto y se aparearon de acuerdo a la edad y al estrato socioeconómico con 70 mujeres que conformaron el grupo control (n=140). Características demográficas, condiciones de salud y estilo de vida de las mujeres de la población de estudio, se obtuvieron mediante una encuesta especialmente diseñada; así mismo, las características de la exposición al humo de leña y de las cocinas, fueron identificadas a través de visitas a cada uno de los hogares de las mujeres expuestas. Las mujeres expresaron participar voluntariamente en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado y la toma de las muestras se realizó bajo medidas de asepsia sin riesgos potenciales para las mujeres de los grupos de estudio. Las muestras de la mucosa bucal fueron obtenidas, procesadas y teñidas con el reactivo de Feulgen según el protocolo modificado de Tolbert, mientras que, para las muestras del epitelio respiratorio nasal se utilizó el protocolo estandarizado en el laboratorio por las presentes autoras, empleando la tinción Feulgen a la cual se le realizaron modificaciones. En el epitelio bucal se evaluaron biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad y de muerte celular, y en el epitelio nasal de genotoxicidad y citotoxicidad.

La comparación de los cambios nucleares entre el grupo expuesto y no expuesto al humo de leña, indicó tanto en el epitelio nasal como en el epitelio bucal un aumento altamente significativo ($p=0,000$) para los biomarcadores micronúcleos, brotes nucleares y células binucleadas. Con respecto a los biomarcadores de muerte celular, solamente las células cariorréticas presentaron un aumento significativo de $p=0,017$. Contrariamente, las células tri-polinucleadas en el epitelio nasal presentaron una disminución no significativa del 36% en el grupo expuesto en relación al referente ($p= 0,277$).

Las frecuencias de micronúcleos y brotes nucleares fueron mayores en el epitelio nasal que en el epitelio bucal en los dos grupos de estudio ($p= 0,000$), lo que podría deberse a su distribución celular; no obstante, la frecuencia de células binucleadas fue mayor en el epitelio bucal ($p= 0,340$). El tiempo de exposición al humo de leña y las condiciones de la infraestructura de la cocina influyeron en la frecuencia de algunos biomarcadores así como el estilo de vida de las mujeres. Este estudio permitió concluir que el daño generado por la exposición al humo de leña es medible a través de biomarcadores de efecto temprano, que permiten anteceder a enfermedades respiratorias o procesos cancerígenos en epitelios de las vías respiratorias superiores. Del mismo modo, pone en perspectiva el uso del epitelio nasal como tejido útil y sensible para la valoración de sustancias y exposiciones ambientales u ocupacionales, siendo aún más sensible que el epitelio bucal.

INTRODUCCIÓN

Estadísticas de la OMS muestran que aproximadamente 3 mil millones de personas (45% de la población mundial), la mayor parte perteneciente a los países en desarrollo,^{1,2} dependen del carbón y de biomasa en forma de leña, estiércol y residuos de cosechas para obtener energía doméstica.³ En Colombia viven aproximadamente 12 millones de personas (20% de la población Colombiana) en zonas rurales y la gran mayoría no disponen de condiciones para acceder al gas natural, petróleo o electricidad, por lo que utilizan la biomasa para la calefacción y cocción de los alimentos.⁴ En el departamento del Cauca, aproximadamente el 59% de la población, se encuentra ubicada en zonas rurales y alrededor del 85% de esta población rural emplea biomasa para cocinar.⁵

En el 2010, la IARC clasificó la biomasa como un agente probablemente cancerígeno para los seres humanos (2A), debido a que durante su pirólisis se producen más de 200 compuestos y varios de estos tienen comprobada acción carcinogénica.^{6,7} Entre los más potentes están los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales interactúan directamente con el ADN ubicándose entre bases adyacentes y ocasionando lesiones primarias que pueden llevar a mutaciones.⁸ El principal HAP, es el benzo[a]pireno (B[a]P), clasificado por la IARC como un agente cancerígeno. Estudios epidemiológicos han estimado que las concentraciones de B[a]P contenidas en el humo de biomasa producido durante tres horas de combustión, son equivalentes al contenido de este compuesto en el humo de dos paquetes de cigarrillo.⁹

Más del 90% de los cánceres se originan en los tejidos epiteliales como consecuencia de la exposición a agentes cancerígenos en el medio ambiente o en el trabajo. Dentro de estos agentes de riesgo se encuentra el humo de leña, el cual se ha asociado al desarrollo de cáncer en epitelios que recubren los bronquios, conductos del esófago, parte superior del tracto aerodigestivo, vías aéreas superiores, orofaringe, mandíbula, lengua y pulmones.^{10,11} Además, diferentes estudios epidemiológicos han concluido que la exposición al humo de leña conlleva al desarrollo de otras enfermedades como lo son insuficiencia ponderal al nacer, aumento de la mortalidad perinatal y de lactantes, tuberculosis, cataratas y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).¹²

El daño causado por las exposiciones ambientales y ocupacionales a agentes genotóxicos, puede ser evaluado mediante el biomarcador micronúcleo (MN), el cual ha sido validado en linfocitos de sangre periférica debido a un claro incremento en la frecuencia de este biomarcador tanto en los tejidos diana como en linfocitos de sangre periférica en pacientes con cáncer.¹⁰ Sin embargo, debido a que la mayoría de los cánceres son epiteliales, es necesaria la validación de MN en estos tejidos, por lo cual es de gran importancia la elaboración de este tipo de estudios que permitan evaluar la exposición en epitelios. En el epitelio bucal se ha venido implementando el ensayo Citómico que además de incluir el biomarcador MN permite valorar otros biomarcadores de genotoxicidad como brotes nucleares (BrN), citotoxicidad como binucleadas (BN) y el efecto apoptótico mediante biomarcadores de muerte celular como células con cromatina condensada (Cc), células cariorréticas (Cr), células picnóticas (Pn) y células cariolíticas (Cl). Por lo cual, el principal objetivo de este estudio es evaluar los efectos genotóxico y citotóxico del humo de leña en los epitelios bucal y nasal, pues estos recubren las principales cavidades por las cuales el organismo entra en contacto directo con los contaminantes ambientales provenientes de la combustión de la leña. Una ventaja importante de la obtención de tejidos epiteliales nasal y bucal es su bajo nivel de invasividad, por lo cual

tiene un gran potencial como un método rápido para la evaluación de riesgo en poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos, así como para conocer el daño producido en tejidos de vías aéreas inferiores.

El presente estudio se conducirá en una población de mujeres expuestas crónicamente al humo de leña pertenecientes a zonas rurales aledañas a los municipios de Popayán y Timbío (Cauca), con el fin de ampliar los conocimientos del daño genotóxico y citotóxico producido por esta exposición ambiental así como contribuir a bases científicas para la validación del biomarcador MN como un premonitor para el riesgo de cáncer en células exfoliadas del epitelio nasal y bucal. Este trabajo también puede aportar conocimientos que permitan a las entidades gubernamentales la creación de estrategias de promoción y prevención, y así reducir la tasa de incidencia de enfermedades relacionadas con este factor de riesgo. Sus resultados servirán para concientizar a las poblaciones expuestas a este factor de riesgo y para justificar la implementación de proyectos de generación de energía amigables con el medio ambiente y asequibles para las poblaciones de bajos recursos.

1. PROBLEMÁTICA

Los altos niveles de contaminación del aire en espacios cerrados se han convertido en un problema de salud pública de gran impacto a nivel mundial, nacional y regional, siendo clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la segunda causa de morbilidad después de aguas contaminadas por ser responsable de casi 2 millones de muertes en países en desarrollo y del 4% de la carga mundial de enfermedad.¹³ Entre los contaminantes en interiores, se encuentra el humo producido por la combustión de biomasa, el cual se refiere a la combustión de material de origen animal o vegetal incluyendo carbón vegetal, madera, residuos agrícolas y estiércol. Este combustible es utilizado por aproximadamente la mitad de la población mundial (3 mil millones de personas) y se prevé que para el 2030 otros 200 millones de personas dependerán de la biomasa como una de las principales y a menudo la única fuente de energía doméstica para calefacción y cocción de los alimentos.^{3,14,15} La OMS y El Banco Mundial, estiman que 700 millones de mujeres se encuentran afectadas principalmente por la contaminación generada durante la pirolisis de la biomasa debido al papel que desempeñan en el hogar.¹ Colombia cuenta con alrededor de 17 millones de personas que habitan en zonas rurales (36% de la población Colombiana) y es de esperarse que la gran mayoría recurra a la biomasa como como fuente de energía para la calefacción y cocción de los alimentos.^{16,17} El Banco Mundial realizó un análisis del impacto económico de la exposición al humo de biomasa y encontró que el costo anual al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS) de Colombia en promedio es de 415 billones de pesos.¹⁸ En el departamento del Cauca, aproximadamente el 59% de la población (765.580 habitantes), se encuentra ubicada en zonas rurales y alrededor del 85% (650.743 habitantes) de esta, emplean biomasa para cocinar.⁵ Aunque la exposición al humo generado por la pirolisis de la biomasa representa un factor de riesgo, su uso se ha incrementado considerablemente en los últimos años, debido a las condiciones socioeconómicas que presentan los países en desarrollo.^{3,19}

La leña es el tipo de biomasa más empleada por las poblaciones expuestas y es quemada a menudo en fogatas abiertas o en estufas improvisadas pobremente en habitaciones sin o con poca ventilación, lo que contribuye a los altos niveles de los productos de combustión incompleta dentro de la casa.²⁰ La deficiencia de la combustión, conlleva a la formación y emisión de algunos gases cancerígenos y tóxicos como el benzo(a)pireno y otros 200 más, los cuales se encuentran dentro de los hogares en concentraciones por encima del máximo aceptado por las normas internacionales.^{21,22} Su presencia en espacios cerrados puede provocar efectos devastadores y riesgos potenciales para la salud, siendo asociada a un aumento de la mortalidad por neumonía y otras enfermedades agudas de las vías respiratorias inferiores en los niños; mientras que en adultos causa 21% de las muertes por infecciones respiratorias bajas y cerca del 35% por EPOC.^{23,24} Da origen a aproximadamente el 36% de las infecciones respiratorias bajas y el 22% de EPOC.^{21,25} Igualmente, las personas expuestas pueden padecer de tuberculosis, enfermedades crónicas en vías aéreas inferiores como en pulmones, bronquios, conductos del esófago, parte superior del tracto respiratorio, y afecciones en las vías aéreas superiores. Además, diferentes estudios epidemiológicos han concluido que la exposición al humo de leña conlleva al padecimiento de insuficiencia ponderal al nacer, aumento de la mortalidad perinatal y de lactantes, flema crónica, degeneración de la visión como cataratas, alergias, conjuntivitis y ceguera.^{13,26}

En algunos hogares, mujeres que cocinan durante 3 horas al día pueden estar expuestas a cantidades similares de B[a]P equivalentes a lo producido por dos paquetes de cigarrillos

diarios. Las toxinas y sustancias cancerígenas liberadas en la combustión de la leña pueden hacer que los tejidos que recubren el sistema respiratorio sean más propensos a desarrollar cáncer que los tejidos normales,¹³ puesto que al ser inhalado, atraviesa el sistema de filtración nasal y oral, depositándose en la mucosa de las vías aéreas superiores o en los alveolos entrando en contacto directo con los tejidos que recubren algunos órganos como lengua, mandíbula, laringe, orofaringe, tracto nasofaríngeo, pulmones y bronquios.^{10,11} Investigaciones elaboradas por la OMS han reportado que la exposición al humo de leña causa el 3% de cáncer de pulmón, y el 1,5% de los cánceres de tráquea y bronquios a pesar de la ausencia de un historial de tabaquismo.^{21,24,25,27} Igualmente, investigaciones elaboradas entre el Banco Mundial y el Ministerio de Ambiente encontraron que a causa de la contaminación atmosférica debido al humo de leña, en Colombia mueren cerca de 6.000 personas al año por enfermedades cardiopulmonares, cáncer de pulmón e infección respiratoria aguda.²⁸

Los tejidos epiteliales que se encuentran inmediatamente expuestos al humo de leña son los que recubren las cavidades bucal y nasal. Aunque no se ha encontrado una asociación entre esta exposición y el desarrollo de cáncer en estos epitelios, se ha observado que el cáncer bucal es uno de los 10 más comunes en el mundo, los sitios primarios de aparición incluyen la mucosa bucal (36%), lengua (20%), alvéolos (20%), encía (9%), labio (4%), paladar (5%), piso de la boca (4%) y seno maxilar (2%).²⁹ Por otro lado, los tumores malignos de nariz y senos paranasales constituyen el 1% de todas las neoplasias malignas del organismo y cerca del 3% de los provenientes del tracto respiratorio superior.³⁰

La asociación exposición-enfermedad solo ha sido posible gracias a datos limitados de estudios epidemiológicos en humanos y experimentos con animales, que indican que la exposición al humo de leña aumenta la susceptibilidad de los individuos a padecer algún tipo de enfermedad respiratoria, permitiendo a la IARC clasificar al humo de leña como agente probablemente cancerígeno para los seres humanos (Grupo 2A).^{13,31} Actualmente, la mayoría de investigaciones realizadas mediante estudios epidemiológicos tradicionales y estudios experimentales han medido las concentraciones de los compuestos dentro del interior de las viviendas y los efectos de esta exposición sobre los pulmones y la función inmune.³² Sin embargo los efectos genotóxicos han recibido poca atención, encontrándose pocos estudios epidemiológicos moleculares que evalúen el daño genético causado por el humo de leña mediante biomarcadores moleculares como el de Alteraciones Cromosómicas (AC) y el de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica.^{33,34} Actualmente, solo un estudio a nivel mundial evalúa el efecto de esta exposición en el epitelio bucal empleando el biomarcador de micronúcleos (MN);³⁵ no obstante, no se han llevado a cabo estudios utilizando el biomarcador de MN en el epitelio nasal y, menos aun empleando estos dos tejidos simultáneamente.

Es así como el objetivo de esta investigación es realizar una medición de los efectos genotóxicos, citotóxicos y de muerte celular en mujeres expuestas crónicamente al humo de leña, mediante la evaluación de células exfoliadas del epitelio nasal y bucal empleando la prueba de Micronúcleos. La pregunta a responder es: ¿El humo de leña modula la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en células exfoliadas de los epitelios nasal y bucal en individuos expuestos crónicamente al humo de leña? Si es así, es de esperar que los individuos expuestos al humo de leña, presenten un número significativamente mayor de todos o algunos de estos biomarcadores en las células exfoliadas de los epitelios nasal y bucal que el grupo referente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico producido por la exposición crónica al humo de leña en los epitelios nasal y bucal mediante el Ensayo de Micronúcleos y otras anomalías nucleares, en un grupo de mujeres de zonas rurales cercanas a los municipios de Popayán y Timbío, Cauca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1.** Evaluar el daño genotóxico y citotóxico mediante el Ensayo de Micronúcleos y otras anomalías nucleares en células exfoliadas del epitelio nasal en mujeres expuestas crónicamente al humo de leña y en mujeres no expuestas.
- 2.2.2.** Evaluar el daño genotóxico, citotóxico y de muerte celular mediante el Ensayo Citómico de Micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal en mujeres expuestas crónicamente al humo de leña y en mujeres no expuestas.
- 2.2.3.** Comparar la sensibilidad de los tejidos epiteliales nasal y bucal para detectar el efecto genotóxico y citotóxico del humo de leña como un factor de riesgo.
- 2.2.4.** Determinar si la edad de las mujeres y el tiempo de exposición al humo de leña, modulan las frecuencias de los biomarcadores evaluados.

3. JUSTIFICACIÓN

Organizaciones internacionales como la OMS, OPS y la ONU, han desarrollado diferentes investigaciones que han permitido alertar a los agentes gubernamentales sobre la gravedad del uso de la leña como biocombustible, con el fin de implementar estrategias que aporten a la disminución de esta exposición y su impacto sobre la salud de las personas.³⁶⁻³⁸ Varios países han reconocido que la salud de las personas depende de los Determinantes Sociales de la Salud como son condiciones sociales, políticas y económicas, los cuales influyen en el nivel de la exposición, razón por la que se han implementado proyectos que mejoran las condiciones de vida de las personas e iniciativas que incentivan el uso de estufas eficientes para la generación de energía limpia y confiable.³⁹⁻⁴³ En Colombia, una de las siete Dimensiones Prioritarias del Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021 es la Salud Ambiental, donde la meta es la disminución de viviendas inadecuadas en zonas rurales, la ejecución de políticas de prevención, promoción y control de la calidad del aire al interior de los hogares y de alternativas orientadas a la vigilancia epidemiológica.⁴⁴ Aun cuando Colombia está haciendo un esfuerzo para lograr los Objetivo del Desarrollo del Milenio (ODS) propuestos por la ONU en el año 2000, las condiciones de vida de la Región Pacífica no son favorables, encontrándose que hasta el año 2003 el 41% de los hogares cocinaban con leña o carbón.⁴⁵ De acuerdo con todos estos lineamientos nacionales e internacionales, es pertinentemente la realización de estudios de biomonitorio como el nuestro, que sustenten la implementación de estrategias que permitan disminuir los riesgos potenciales para la salud generados por la exposición crónica al humo de leña.

Según la IARC, son muchos los estudios que evidencian la carcinogenicidad de algunos de los compuestos del humo de leña como el benzo(a)pireno y el formaldehído, sin embargo pocos han determinado el efecto cancerígeno del humo de leña,²² especialmente en tejidos epiteliales donde se originan más del 90% de los cánceres, debido a que estos se encuentran en contacto directo con compuestos tóxicos.⁴⁶ Puesto que el humo de leña entra al organismo a través de las cavidades bucal y nasal, a las mujeres que conformaron la población de estudio se les tomó muestras de los epitelios que recubren dichas cavidades. Además, estos epitelios son accesibles y su estudio podría conducir al desarrollo de herramientas no invasivas y adecuadas para la detección temprana del cáncer de pulmón.

Para evaluar el daño genotóxico y citotóxico en los epitelios nasal y bucal, es de gran importancia la implementación de biomarcadores con el fin de anticipar el diagnóstico clínico y prevenir el cáncer en las poblaciones en riesgo. Para este fin, se empleó el Ensayo de Micronúcleos y otras anomalías nucleares, a través del cual es posible evaluar daño al ADN, defectos en la citocinesis, potencial proliferativo y muerte celular; asociándolos con un alto riesgo de cáncer, procesos carcinogénicos, trastornos neurovegetativos y envejecimiento prematuro.⁴⁷ Además, presenta notables ventajas como la simplicidad, rapidez y sensibilidad de la prueba, así como la posibilidad de analizar muchas células dado que no se requieren en metafase, permitiendo la evaluación de daños en el ADN sin la necesidad de la replicación celular. Otra ventaja es su utilización en estudios con animales de laboratorio y seres humanos *in vivo* o *in vitro*, lo que la convierte en una herramienta valiosa y útil en los estudios clínicos y epidemiológicos.^{48,49}

El biomarcador MN está incluido dentro del Ensayo Citómico y ha sido validado en linfocitos de sangre periférica por su alto valor predictivo debido a un claro incremento de su frecuencia en

pacientes con cáncer.⁵⁰ Sin embargo, aun cuando las exposiciones afectan en especial a los epitelios por ser tejidos diana, este biomarcador no se encuentra validado en estos. Aplicar este ensayo en células epiteliales es adecuado porque presenta una viabilidad similar a la de linfocitos de sangre periférica, puesto que en exposiciones crónicas la frecuencia de MN se correlacionan, lo cual sugiere que aun cuando existen diferencias en la cinética de replicación y la vida media entre estos dos tejidos, los efectos dañinos son de magnitud similar en los tejidos linfoides y epiteliales.⁵¹

Hasta la fecha se han realizado diferentes estudios que evalúan exposiciones ocupacionales y ambientales en el epitelio bucal empleando el Ensayo Citómico o el de Micronúcleos, pero son muy pocas las investigaciones realizadas que permiten evaluar el efecto de la exposición de contaminantes ambientales y de sustancias genotóxicas en el epitelio nasal empleando el biomarcador de MN, y son menos aún las que evalúan otras anomalías nucleares, siendo menos de 5 a nivel mundial.⁴⁶ Del mismo modo, se encontró un número similar de publicaciones que emplean estos biomarcadores en los epitelios nasal y bucal al mismo tiempo. A nuestro conocimiento, sólo hay un estudio que evalúa la exposición al humo de leña en mujeres empleando el biomarcador de MN en el epitelio bucal³⁵ y no se han realizado investigaciones a nivel mundial que evalúen esta exposición en el epitelio nasal. Este es el primer estudio a nivel mundial que emplea simultáneamente estos epitelios para evaluar el efecto del humo de leña, por lo cual, los conocimientos generados aportan información valiosa para la comunidad científica sobre los daños tempranos causados en epitelios de vías aéreas respiratorias superiores,^{11,50} y la idoneidad de las células nasales para la evaluación de sustancias especialmente de inhalación.

Este estudio está acorde con los objetivos del Proyecto Internacional de Micronúcleos en Poblaciones Humanas (HUMN) donde se pretende evaluar los daños citogenéticos en células sanguíneas generados especialmente por exposiciones ambientales y ocupacionales, mediante biomarcadores predictores de riesgo temprano a enfermedades.⁵² Así mismo, está acorde con el propósito del Proyecto Internacional de Micronúcleos en Poblaciones Humanas en Células exfoliadas (HUMNxL), cuyo fin es la validación del biomarcador MN y otras anomalías nucleares en células exfoliadas como indicadores de enfermedades neoplásicas por exposición y envejecimiento prematuro.^{50,52-54} Este estudio proporciona información para la validación del Ensayo de Micronúcleos en células exfoliadas nasal y bucal como un biomarcador de daño del ADN en las células epiteliales.

Los resultados de esta investigación permitirán alertar y concientizar a las comunidades expuestas sobre el riesgo potencial que representa el exponerse al humo de leña. También puede contribuir a iniciativas de proyectos que apunten a instalaciones de fuentes de energía más amigables con el medio ambiente y con la salud de las personas, las cuales estén acordes con los ingresos económicos de los habitantes. El conocimiento generado puede ser útil para que actores estatales formulen políticas de salud y aseguren estrategias efectivas de intervención, como implementar técnicas citogenéticas dentro de los procedimientos de diagnóstico temprano de enfermedades degenerativas como el cáncer. Adicionalmente, El uso de biomasa como biocombustible no sólo trae problemas de salud sino que también produce alteraciones en los ecosistemas, por lo cual alertar a las comunidades sobre los daños que causa esta exposición y disminuir el empleo de leña como biocombustible, reduciría el impacto ecológico que esta actividad causa, ya que es una de las principales causas antropogénicas de la deforestación de los bosques en todo el mundo; observándose que para el 2003 en Sur América el 60% de la madera se talada para utilizarse como leña y América perdió 2.5 de sus bosques, los que corresponde a 56.3 millones de hectáreas.^{55,56}

4. ANTECEDENTES

Organizaciones a nivel mundial como el Foro de las Sociedades Internacionales Respiratorias (FIRS), han realizado investigaciones para cuantificar estadísticamente el uso de biomasa y su relación con diversas enfermedades así como la prevalencia de las mismas;^{22,57-60} así mismo, muchos estudios ponen en manifiesto la exposición al humo de leña como un problema de salud pública, planteando estrategias de educación para disminuir su impacto.^{9,20,61-66}

Estudios de toxicología llevados a cabo mediante sistemas *in vivo*, demostraron en *Salmonella* que el humo de leña fue mutagénico para sistemas bacterianos.⁶⁷⁻⁶⁹ En animales como en conejos, se ha observado que esta exposición produce cambios morfológicos y estructurales en células de pulmón.⁷⁰ En cerdos y perros, tras una exposición aguda se comprobó una afectación de la función pulmonar, como también el aumento de la permeabilidad alvéolo-capilar, permeabilidad microvascular y lesiones puntuales histológicas en las vías respiratorias y los tejidos del parénquima, así como una asociación con afecciones respiratorias, hemorragias intra-alveolares, edema y el riesgo a desarrollar cáncer.⁷¹⁻⁷⁴ En ovejas se relacionó la capacidad oxidativa del humo de leña con el estrés oxidativo en el plasma y los pulmones.⁷ El desarrollo de adenocarcinomas, metaplasia escamosa en la laringe y el aumento de la tasa de cáncer en la piel se asoció en ratas luego de una exposición alta al humo de leña.⁷⁵⁻⁷⁷

Importantes estudios en poblaciones humanas han evidenciado el impacto del humo de leña mediante estudios epidemiológicos transversales, retrospectivos y de caso-control, encontrando una asociación directa entre este factor de riesgo y el desarrollo de enfermedades respiratorias agudas, anfracosfibrosis bronquial, tuberculosis pulmonar, disnea, afección de la función pulmonar, neumonía, EPOC, infección respiratoria aguda, neumopatía, síntomas respiratorios pulmonares e incluso cáncer de cuello uterino, esófago, pulmón y tracto aéreo digestivo así como de ser una de las causas más importantes de mortalidad en niños menores de 5 años en países subdesarrollados por su asociación con infecciones respiratorias.^{16,78-87} Diversos resultados indican un aumento de depresión en mujeres premenopáusicas y del riesgo a cáncer de cuello uterino en aquellas infectadas con el virus VPH al estar expuestas al humo de biomasa.⁸⁸⁻⁹¹ En un estudio realizado en el Cauca en una población de pacientes con cáncer de pulmón, se observó que el 26% reportó exposición crónica al humo de leña y el 42% a cigarrillo y humo de leña simultáneamente, evidenciando la influencia del uso de leña para esta patología en nuestro departamento.⁹²

El efecto genotóxico causado por la exposición al humo de leña, ha sido evaluado en linfocitos de sangre periférica empleando biomarcadores de efecto. Pandey *et al.* (2005) encontraron mediante el ensayo cometa, que aquellas mujeres que usaban combustibles como el estiércol y la leña presentaron mayor daño en el ADN en relación a las que utilizaban petróleo líquido.⁹³ Por otro lado, Sungu *et al.* (2001) y Musthapa *et al.* (2004) identificaron que variables como la edad de las mujeres y el tiempo de exposición al humo de leña producen un aumento significativo de los biomarcadores ICH, MN y AC.^{33,34} Igualmente, un proyecto de intervención realizado en una comunidad indígena de México empleando biomarcadores de efecto y exposición (ensayo cometa, carboxihemoglobina en sangre y niveles urinarios de 1-hidroxipireno), permitió identificar que la eliminación del hollín de techos y paredes, la sustitución de pisos de tierra por pavimentos y la introducción de un horno con chimenea de metal, reduce el riesgo a la enfermedad por la exposición al humo de leña en aquellas familias, lo que se reflejó en una disminución de la frecuencia de los biomarcadores evaluados.⁹⁴

Los epitelios nasal y bucal ofrecen una gran oportunidad para monitorear individuos o poblaciones expuestas a eventos mutagénicos, genotóxicos o teratogénicos, primordialmente mediante la evaluación de células micronucleadas, ya que recubren las principales cavidades por donde ingresan los compuestos tóxicos, son de fácil acceso y permiten el registro de diversos biomarcadores.^{95,96} Sin embargo, hasta la fecha son muy pocos los estudios que se han realizado empleando el epitelio nasal mediante el ensayo de Micronúcleos para evaluar el efecto temprano de exposiciones ambientales y ocupacionales. Adicionalmente, la exposición al humo de leña no ha sido evaluada en este epitelio, siendo el humo de cigarrillo y la polución atmosférica las exposiciones estudiadas que más se le asemejan. En estos estudios, Mergener *et al.* (2014) encontraron en infantes de madres fumadoras una frecuencia de MN del 0,13%, BrN del 0,02%, BN del 0,54% en 2000 células analizadas y Gonsebatt *et al.* (1997) encontraron que los expuestos a altas concentraciones de contaminantes urbanos, presentaron un aumento significativo de la frecuencia de Cc, Cr y Cl (**Cuadro 1**).^{97,98} Otros estudios han evaluado en el epitelio nasal exposiciones como el formaldehído, cromo, cobalto, níquel, estireno y polvo que contiene cristal de sílice, encontrando un aumento significativo de la frecuencia del biomarcador de MN en los individuos expuestos en comparación a los referentes.^{32,99-106}

Por otro lado, los estudios elaborados en el epitelio bucal para evaluar el efecto de las exposiciones ambientales y ocupacionales han aumentado en los últimos años, sin embargo hasta la fecha solo se encontraron en las revisiones científicas tres estudios: en el de Mondal *et al.* (2011) se evaluó el potencial genotóxico del humo de biomasa a través del ensayo cometa y halo en células epiteliales bucales; encontrándose que una exposición crónica provoca estrés oxidativo y daño del ADN.¹⁰⁷ Del mismo modo, en el estudio elaborado por Sisenando *et al.* (2012), se evaluó el efecto del humo de biomasa a través del ensayo de MN en células exfoliadas bucales en niños de edad escolar y se encontró una diferencia significativa en los expuestos en comparación a los referentes.¹⁰⁸ Resultados similares fueron descritos por Mondal *et al.* (2010) quienes encontraron un aumento significativo de la frecuencia de MN, la generación de ROS, y el porcentaje de ADN en la cola del cometa en una población de mujeres expuestas al humo de biomasa en la India, concluyendo que esta exposición causa daños cromosómicos y altera la regulación de los mecanismos de reparación (**Cuadro 1**).³⁵

En las revisiones bibliográficas se encontraron 8 estudios que emplean los epitelios nasal y bucal simultáneamente, de los cuales 6 emplean el biomarcador de MN y dos el Ensayo Citómico.¹⁰⁹⁻¹¹⁶ En los estudios realizados por Burgaz *et al.* (1998) y Sarto *et al.* (1990) no se reportaron diferencias significativas el epitelio bucal para MN entre los grupos de estudio y en los estudios elaborados por Wultsch *et al.* se presentó un aumento significativo para algunos biomarcadores del epitelio bucal y nasal (**Cuadro 1**).^{109,113-115}

En el departamento del Cauca solo se han realizado dos estudios que evalúan el efecto de la exposición al humo de leña mediante el biomarcador de AC en linfocitos de sangre periférica y el Ensayo Citómico en el epitelio bucal. En estos estudios se encontró un aumento de la frecuencia de AC y de los biomarcadores citómicos excepto para MN y BN en las mujeres que cocinan con este biocombustible en relación a las no expuestas.^{117,118}

Finalmente, nuestro estudio amplía el conocimiento del efecto genotóxico y citotóxico del humo de leña mediante la evaluación de la frecuencia de MN, BrN y BN en células del epitelio bucal y nasal y evalúa el efecto apoptótico mediante los biomarcadores de muerte celular (Cc, Cr, Pn y Cl) presentes en el epitelio bucal. Del mismo modo, implementa el biomarcador TN-PN en el epitelio nasal, el cual no ha sido empleado en ningún otro estudio a nivel mundial.

Cuadro 1. Estudios citogenéticos en humanos de evaluaciones ambientales y ocupacionales mediante el Ensayo de Micronúcleos y otras anomalías nucleares en células del epitelio nasal y bucal, realizados entre los años 1991 y 2014.

Cita bibliográfica	Exposición	Biomarcador/ Células	Zona / Tipo de células nasal	Población	Tinción	N° de células	Resultados
Estudios en el epitelio nasal de exposiciones afines al humo de leña							
(Gonsebatt <i>et al.</i> , 1997)	Polución urbana en México	Citómico/ Nasal	Cornete interior/ No indica	60 Exp 60 Ref	Feulgen	6000	Expuestos a polución vs referentes Nasal: MN, BrN, BN no hubo significancia Cc, Cr, Pn, Cl : $p < 0,05 \uparrow$
(Mergener <i>et al.</i> , 2014)	Humo de cigarrillo en infantes menores de 12 meses	Citómico/ Nasal	Septum y cornete medio/ No indica	43 Individuos	Giemsa	2000	Infantes menores de 12 meses: 0, 13% de MN, 0,02% de BrN, 0,54% de BN, 1,20%
Estudios en el epitelio bucal de exposición al humo de leña							
(Perafán & Rosero, 2013)	Biomasa en niños del departamento del Cauca	Citómico/ Bucal	Parte media de las mejillas	54 Exp 54 Ref	Feulgen	2000	Mujeres expuestas vs referentes Vía aérea MN y BN No hubo $p < 0,001 \uparrow$ Cc, Cr, Pn Cl, Pn $p < 0,001 \uparrow$
(Mondal <i>et al.</i> , 2010)	Biomasa al interior del hogar en mujeres premenopáusicas de la India	MN/Bucal y vía aérea Cometa /Linfocitos	Parte media de las mejillas	135 Exp 85 Ref	Papanicolaou	2000 bucal 2000 vía aérea	Mujeres expuestas vs referentes Bucal: MN, BrN, BN, Cr, Pn, Cl Vía aérea: MN, BrN, BN, Cr, Pn Cl $p < 0,001 \uparrow$
(Sisenando <i>et al.</i> , 2012)	Biomasa por quema de bosque en niños del amazonas del Brasil	MN/Bucal	Parte interior de las mejillas	446 Exp (218H, 225M) 128 Ref (54H, 74M)	No indica	2000	Niños expuestos vs referentes MN : $p < 0,01 \uparrow$
Estudios en el epitelio nasal y bucal simultáneamente							
(Sarto <i>et al.</i> , 1990)	Acido crómico y óxido de Etileno en trabadores de una fábrica de cromado y en una unidad de esterilización	MN/Nasal y bucal	Vestíbulo y septum/Epitelio escamosas. Cornete interior/Epitelio respiratorio	25 Exp= 16 Cromo 9 Oxido. E	Feulgen	500-3000 Nasal 1633-3257 Bucal	Expuestos vs referentes Nasal: MN <i>no hubo para O.E</i> Bucal: MN $p < 0,03 \downarrow$ <i>para cromo</i> <i>No hubo para O.E</i>
(Suruda <i>et al.</i> , 1993)	Formaldehido CP= 85 días en estudiantes de Ciencias Mortuorias antes y después	MN/Nasal bucal y linfocitos IHC /Linfocitos	Cornete inferior/ No indica Cara interna de las mejillas	29 Exp (27H; 7M)	Feulgen Giemsa	1500 Nasal 2000 Bucal	Estudiantes después vs antes de la exposición Nasal: MN $p = 0,26 \uparrow$ Bucal: MN $p < 0,05 \uparrow$ Linfocitos: MN $p < 0,05 \uparrow$ Linfocitos: IHC $p < 0,05 \downarrow$
(Titenko-Holland <i>et al.</i> , 1996)	Formaldehido CP= 90 días en estudiantes de Ciencias Mortuorias antes y después	MN/ Nasal y bucal	No indica	28 Exp (22H; 6M)	FISH	1500	Estudiantes después vs antes de la exposición Nasal: MN $p = 0,200 \uparrow$ Bucal: MN $p = 0,007 \uparrow$
(Ying <i>et al.</i> , 1997)	Formaldehido CP= 8 semanas en estudiantes de Anatomía	MN/ Nasal, bucal y linfocitos	No indica	25 Exp	No indica	No indica	Estudiantes después vs antes de la exposición Nasal: MN $p < 0,001 \uparrow$ Bucal: MN $p < 0,01 \uparrow$ Linfocitos: MN $p > 0,05$
(Burgaz <i>et al.</i> , 1998)	Soldadura en trabajadores expuestos	MN/ Nasal bucal y linfocitos	No indica	32 Exp 25 Ref	No indica	No indica	Trabajadores expuestos vs referente Nasal: MN $p < 0,001 \uparrow$ Bucal: MN <i>No hubo</i> Linfocitos: MN $p < 0,05 \uparrow$

CP: Corto Plazo

H Hombres; M= Mujeres

\uparrow = Aumento del biomarcador; \downarrow = Disminución del biomarcador

Continuación del cuadro 1.

Cita bibliográfica	Exposición	Biomarcador/ Células	Zona / Tipo de células nasal	Población	Tinción	N° de células	Resultados
(Wultsch <i>et al.</i> , 2013b)	Gases de estiércol de pollo de fábrica procesadora	Citómico/ Nasal, y bucal	Cornete medio/Escamosas, ciliadas, no ciliadas y basales	25 Exp 21 Ref	Feulgen	≥2000 Nasal ≥2000 Bucal	Trabajadores expuestos vs referente Nasal: MN, BrN, BN Pn No hubo C, Cr, Cl: $p < 0,05$ ↑ Bucal: MN, BrN, BN, Cc, Pn No hubo Cr, Cl $p < 0,05$ ↑
(Wultsch <i>et al.</i> , 2013a)	Soldadores en trabajadores expuestos	Citómico/ Nasal, y bucal	Cornete medio/Escamosas, ciliadas, no ciliadas y basales	22 Exp 25 Ref	Feulgen	2000 Nasal 2000 Bucal	Trabajadores expuestos vs referente Nasal: Pn No hubo MN, BrN, BN, Cc, Cr, Cl $p < 0,01$ ↑ Bucal: MN, Pn No hubo BrN, BN, Cc, Cr, Cl $p < 0,05$ ↑
(Bruschweiler <i>et al.</i> , 2014)	Polvo de madera en trabajadores fabricantes de muebles	MN/Nasal y bucal	Cornete inferior/ No indica	31 Exp 19 Ref	Feulgen	500-1000 Nasal 2000 Bucal	Trabajadores expuestos vs referente Nasal: MN $p < 0,001$ ↑ Bucal: MN $p < 0,001$ ↑

CP: Corto Plazo

H Hombres; M= Mujeres

↑ =Aumento del biomarcador; ↓ = Disminución del biomarcador

5. MARCO TEÓRICO

5.1 TOXICIDAD DEL HUMO DE LEÑA

5.1.1 Componentes del humo de leña. El uso de la leña en forma de madera y residuos agrícolas es una fuente de energía importante a nivel mundial. Por su naturaleza orgánica la leña es un material que se compone principalmente de dos polímeros: celulosa (50-70% en peso) y lignina (aproximadamente el 30% en peso); además de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (resinas, ceras, azúcares) y sales inorgánicas. Durante la combustión, los polímeros se rompen para producir una variedad de moléculas más pequeñas; en consecuencia, una parte importante del carbono no llega a convertirse en dióxido de carbono sino en productos de combustión incompleta.⁶⁰ Estos productos liberados son una mezcla compleja de partículas y gases incluyendo según Cooper, 17 tipos de sustancias consideradas “contaminantes prioritarios”, más de 14 compuestos carcinógenos, 6 compuestos tóxicos para los cilios de las células columnares del epitelio nasal y agentes muco-coagulantes.¹⁵

Dentro de los principales compuestos generados por la combustión incompleta del humo de leña se encuentran: El *material particulado*; formado por la condensación de los gases y clasificado en tres tipos según su tamaño y origen: partículas ultrafinas, su tamaño $<1 \mu\text{m}$ facilita su transporte por kilómetros y se forman por la rápida condensación del humo a medida que este se enfría; partículas respirables, con un tamaño entre 1 y $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$) y partículas inhalables, con un tamaño entre 2,5 y $10 \mu\text{m}$ (MP_{10}), estas últimas son gruesas y no transportables. Las partículas $\text{MP}_{2,5}$ y MP_{10} , son el resultado de la suspensión de cenizas y escombros de combustibles sólidos y se diferencian por su composición química y su tamaño, que determinan la profundidad y velocidad a la cual pueden viajar dentro y fuera de las vías respiratorias.^{22,119} Las normas de la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos establecen que los límites en 24 horas de MP_{10} y $\text{MP}_{2,5}$ son de $150 \text{mg}/\text{m}^3$ y $65 \text{mg}/\text{m}^3$ respectivamente. Sin embargo, las concentraciones en locales cerrados suelen superar muchas veces estos niveles, situándose en el intervalo $300\text{--}3000 \text{mg}/\text{m}^3$, y pueden llegar a los $30000 \text{mg}/\text{m}^3$ o más durante la preparación de los alimentos.¹⁹ Los *hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)*; son una clase importante de contaminantes o xenobióticos que se liberan en forma de vapores y se condensan sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas que pueden ser transportadas a grandes distancias por los vientos, siendo el principal el benzo[a]pireno.¹²⁰ Los *aldehídos*; como la acroleína y el formaldehído (HCHO); *especies reactivas de oxígeno (ROS)*; *iones metálicos*⁹³ y *gases inorgánicos* como monóxido de carbono (CO) producto directo de la combustión, ozono (O_3) producto secundario de los óxidos de nitrógeno de hidrocarburos y dióxido de nitrógeno (NO_2) producto de la oxidación a altas temperaturas del nitrógeno del aire. Hasta la fecha se han identificado aproximadamente 200 componentes del humo de leña y su capacidad carcinogénica ha sido evaluada por la IARC. Algunos de estos compuestos se enumeran en el **Cuadro 2.**^{22,121}

Cuadro 2. IARC evaluaciones de los compuestos presentes en las emisiones de la combustión de leña o carbón

Hidrocarburos aromáticos policíclicos				Compuestos orgánicos volátiles		Metales	
Compuesto	Grupo IARC	Compuesto	Grupo IARC	Compuesto	Grupo IARC	Compuesto	Grupo IARC
Benzo[a]antraceno	2B	Dibenzo[a,h]antraceno	2A	Acetaldehído	2B	Arsénico	1
Benzo[b]fluoranteno	2B	Criseno	2B	Benceno	1	Níquel	1
Benzo[k]fluoranteno	2B	Ciclopenta[cd]pireno	2A	1,3-Butadieno	2A		
Benzo[a]pireno	1	Indeno[1,2,3-cd]pireno	2B	Formaldehído	1		
		Naftalina	2B	Estireno	2B		

1 indica que el agente es cancerígeno para los seres humanos; 2A indica que es probablemente cancerígeno para los seres humanos; 2B indica que es posiblemente carcinogénico en seres humanos. Modificado de la IARC.²²

5.1.2 Metabolismo de algunos compuestos del humo de leña. Al condensarse los compuestos producidos por la combustión de la leña forman partículas que entran al organismo a través de las cavidades bucal y nasal. Las partículas de gran tamaño ($> 2,5 \mu\text{m}$) son depuradas en un 85% y las partículas respirables y ultrafinas ($< 2,5 \mu\text{m}$) en un 5%,¹²² mediante un mecanismo denominado escalera mecánica mucociliar que se lleva a cabo en el epitelio respiratorio pseudoestratificado, en el cual el moco producido por las células caliciformes, atrapa los residuos del aire y luego este es transportado hacia la cavidad oral por los cilios presentes en la zona apical de las células columnares.¹²³ Sin embargo las partículas que no logran ser eliminadas llegan fácilmente a la región alveolar del pulmón donde los compuestos químicos unidos a las partículas pueden ser transportados profundamente en el pulmón dependiendo de su solubilidad, o bien pueden permanecer o disolverse lentamente en el fluido pulmonar.²² En el proceso de oxigenación de la sangre, los compuestos pasan al torrente sanguíneo e interactúan con el estrato basal de los epitelios nasal y bucal a través del tejido conectivo. Mediante la expresión de la enzima citocromo P450 las células de estos epitelios del sistema respiratorio superior, metabolizan los compuestos a ROS. La moléculas ROS producidas por el metabolismo del PM, interactúan en primera medida con la membrana celular causando una peroxidación lipídica, la cual se traduce en la liberación de radicales (*R*, RO, y ROO*).¹²⁴ Este daño causado en la membrana celular lleva a una liberación de hierro catalíticamente activo lo que aumentaría la generación de ROS y la formación de aldehídos (hexanal y 4 hydroxynonenal).¹²⁵ Los productos de esta peroxidación lipídica, si no son metabolizados por enzimas antioxidantes, interactúan directamente con el ADN, causando bases oxidadas, sitios abásicos, rupturas de cadena doble y sencilla que pueden llevar a mutaciones y enfermedades degenerativas como el cáncer si estos daños no son reparados o se reparan incorrectamente.^{126,127} La presencia de estos compuestos en las vías aéreas se reflejan en respuestas inflamatorias y en el desarrollo de enfermedades como el asma, fibrosis, EPOC, cáncer, modificaciones inmunológicas, entre otras.¹²⁸

Los HAP son otros compuestos importantes presentes en el humo leña siendo el más representativo el benzo[a]pireno (B[a]P); el cual después de su ingestión, absorción es biotransformado mediante dos vías metabólicas que incluyen 3 pasos: **1)** la oxigenación por las oxidasas microsomales de función mixta (MFO), sistema enzimático que forma parte del retículo endoplasmático de las células del hígado y consisten en un terminal de citocromo (P-450) y una cadena de transporte de electrones.¹²⁹ **2)** la hidratación de los compuestos intermedios de epóxido a dioles y su posterior oxigenación de estos últimos a diol-epóxidos y **3)** la conjugación de los compuestos intermedios solubles en agua oxigenados a sulfatos, glutationes o glucurónidos.¹³⁰ Este procedimiento se detalla a continuación (**Fig. 1**):

En la primera vía metabólica, el B[a]P es oxigenado inicialmente por las MFO a *fenoles* los cuales muestran un nivel muy bajo de mutagenicidad. Estos fenoles pueden conjugarse con compuestos solubles en agua por la UDP-glucuronil-transferasa a glucurónidos. De estos

glucurónidos, el 3-OG obtenido del fenol 3-OH es hidrolizado por β -glucuronidasa, formando un producto intermedio que se une al ADN. Los fenoles también pueden transformarse no enzimáticamente a *quinonas*, compuestos no mutagénicos con o sin activación metabólica; finalmente algunos fenoles y quinonas son conjugados a sulfatos por las sulfotransferasa.¹³⁰

En la segunda vía metabólica, el B[a]P es oxigenado inicialmente por las MFO a *epóxidos*, los cuales reaccionan covalentemente con el ADN y el ARN. Estos epóxidos serán oxidados por la epóxido hidratasa para obtener *dioles*.⁸ Dentro de los dioles formados, el *trans*7,8-diol se une al ADN en un grado mucho mayor que cualquiera de los otros dioles, ya que es el compuesto más activo que requiere metabolismo para ser mutagénico. Los dioles son oxidados por las MFO para obtener dos estereoisómeros: *epóxido diol I* y *epóxido diol II*, compuestos altamente reactivos y alquilantes, capaces de formar aductos con el ADN, ARN, diversos componentes de las proteínas de la cromatina y ciertas proteínas no histónicas. El epóxido diol I es el principal metabolito mutagénico del B[a]P,⁸ mientras el epóxido diol II, aunque más reactivo químicamente, tiene una menor potencia mutagénica, posiblemente por su mayor reactividad química que le impide alcanzar el ADN tan fácilmente como el diol epóxido I.¹³⁰ Estos epóxidos, en ausencia de enzimas serán hidrolizados a cuatro *tetroles* y reducidos a dos *trioles* mediante NADPH o NADH, estos metabolitos son los más polares, sugiriendo que NADPH y NADH tienen un papel en la inactivación de los epóxidos diol y por lo tanto son factores de desactivación del B[a]P y de la carcinogénesis.¹³⁰

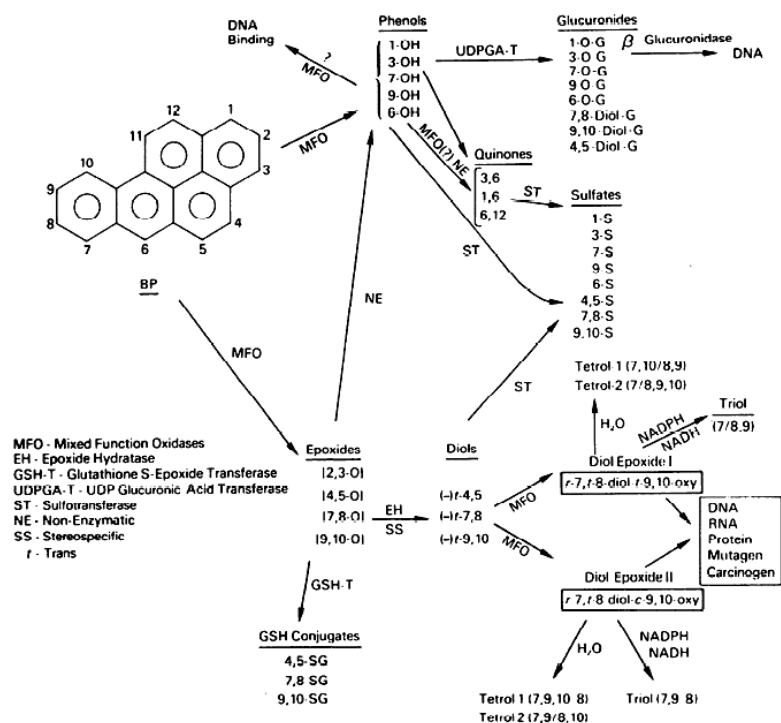


Figura 1. Metabolismo y mecanismo de acción del B[a]P. Tomado de Weininger *et al.* (1988).⁸

Otros componentes del humo de leña son iones metálicos como Fe(II), que reaccionan principalmente con las moléculas de H_2O_2 producidas por los macrófagos alveolares durante los procesos de respiración y fagocitosis de las partículas del humo de leña, obteniéndose predominantemente radicales $OH\cdot$.¹²⁵ Igualmente, los aldehídos y los gases inorgánicos,^{6,7} interactúan con la célula alterando la membrana celular y generando compuestos intermedios y radicales libres que al igual que los HAP producen inestabilidad genómica.^{22,131}

5.2 REPARACIÓN DEL ADN

Para reparar los daños en el ADN causados por las exposiciones, las células han desarrollado múltiples mecanismos de reparación en el que cada uno corrige una lesión específica. Las células de mamíferos presentan cinco principales mecanismos de reparación del ADN: reparación por escisión de bases (BER), reparación mismatch (MMR), reparación por escisión de nucleótidos (NER), y reparación de doble cadena, que incluye tanto la recombinación homóloga (HR) la cual es libre de errores y extremos no homólogos (NHEJ) propensa a errores.¹³² La exposición al humo de leña genera principalmente quiebres de cadena doble (DSB), los cuales detienen el ciclo celular para que se lleve a cabo la reparación de la lesión mediante el mecanismo de extremos no homólogos (NHEJ) (**Fig. 2**), el cual predomina en los mamíferos y se presenta principalmente en G₀/G₁. Al generarse una ruptura de cadena doble quedan libres los extremos del ADN, sobre los cuales se une el complejo holoenzima DNA-PK formado por tres subunidades: una subunidad catalítica, la proteína quinasa de ADN (DNA-PKcs) y dos subunidades llamadas ku 80 y ku 70.^{133,134} Este complejo se une a los extremos rodeando completamente el dúplex de ADN, permitiendo alinearlos.^{132,135} Los extremos de ADN son procesados por el complejo MRE11-Rad50-NBS1, que muestra actividad exonucleasa, endonucleasa y helicasa y elimina el exceso de ADN del extremo 3'. Se cree que la endonucleasa Fen-1 (FEN1) es responsable de la eliminación del extremo 5'.¹³⁶ Otra proteína encargada del procesamiento de los extremos y que actúa junto al complejo ADN-PK es la proteína Artemis, una endonucleasa que procesa y digiere los extremos para que puedan ser religados.^{136,137} Estos complejos mantienen unidos los extremos ya procesados permitiendo que la ADN ligasa IV junto con la fosfoproteína nuclear XRCC4 sellen la unión entre los extremos. Finalmente se obtiene la molécula de ADN reparada habiéndose perdido algunos pocos nucleótidos en la mayoría de los casos.^{132,137} Si esta reparación no tiene lugar, la célula entra a apoptosis; pero si la reparación se lleva a cabo pueden ocurrir: 1) que la reparación se desarrolle correctamente permitiendo que el ciclo celular se reinicie o 2) que se desarrolle incorrectamente y el ciclo celular se reinicie pero en este caso la célula presentará inestabilidad genómica que terminan en daños cromosómicos observables como MN, BrN y otros biomarcadores.¹³²

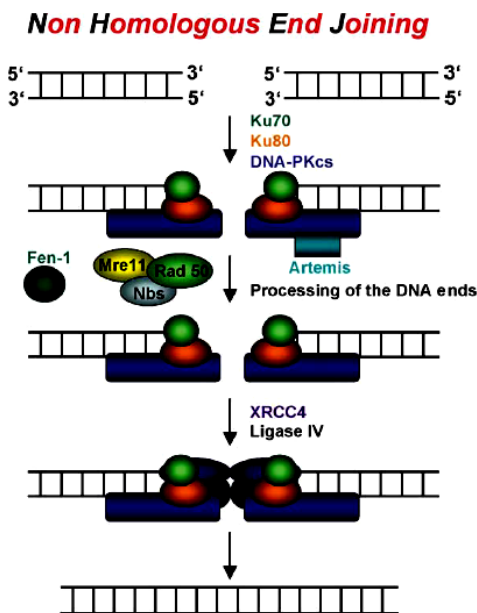


Figura 2. Mecanismo de reparación del ADN por extremos no homólogos (NHEJ). Tomado de Christmann *et al.* (2003).¹³⁷

5.3 BIOMARCADORES

Los biomarcadores son indicadores de eventos medibles en los sistemas o muestras biológicas que reflejan alteraciones bioquímicas, fisiológicas, estructurales o morfológicas a nivel molecular y celular, que ocurren por exposición a contaminantes ambientales u ocupacionales tanto en poblaciones naturales como en organismos expuestos experimentalmente.^{138,139} En estudios epidemiológicos, permiten identificar la magnitud de la exposición y la respuesta del organismo al contaminante. Así mismo, actúan como los primeros centinelas para detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico o una enfermedad, dando las pautas para la prevención de la misma e identificar tanto el efecto de la exposición como la susceptibilidad individual a factores de riesgo en una población.¹⁴⁰⁻¹⁴² De acuerdo a su significancia toxicológica se han clasificado en 3:

5.3.1 Biomarcadores de efecto temprano. Miden eventos intermedios entre la exposición y el desarrollo de la enfermedad tales como la formación de aductos y cambios en el ADN que se expresan como MN, AC, ICH entre otros. Así mismo, miden cambios en el ARN, la expresión de proteínas, la composición celular sanguínea, actividades enzimáticas y en las funciones pertinentes a la carcinogénesis (la reparación del ADN, la respuesta inmunológica, etc).^{143,144} Generalmente se miden en tejidos sustitutos de fácil acceso y varios ofrecen una contribución importante para la epidemiología molecular, ya que son usados en biomonitoreos de poblaciones expuestas ambiental y ocupacionalmente para la evaluación del efecto temprano e identificación de grupos en riesgo.¹⁴³

5.3.2 Biomarcadores de exposición. Pueden ser compuestos exógenos o metabolitos medibles dentro del organismo, ya sea en órganos, compartimientos, aire espirado o fluidos (sangre y orina, fundamentalmente).¹⁴⁵ Permiten detectar si un individuo ha estado expuesto a un xenobiótico o a un agente tóxico, y adicionalmente permiten la cuantificación de la absorción, estableciendo la presencia del tóxico o algunos de sus metabolitos en muestras biológicas.¹⁴⁴ Igualmente, determinan la respuesta de un organismo frente a una exposición mediante la evaluación de la dosis interna y la dosis biológicamente efectiva, reflejando la aparición de efectos adversos en la salud.¹⁴⁶

5.3.3 Biomarcadores de susceptibilidad. Sirven como indicadores de sensibilidad individual a daños en el ADN provocados por agentes endógenos o exógenos, contribuyendo a la identificación de subgrupos de alto riesgo de una población.¹⁴³ Entre ellos se encuentran los polimorfismos en genes responsables de la actividad química o detoxificación (GSTT1, GSTM1), reparación de ADN (XRCC1, APE1) y estabilidad genómica entre otros.¹⁴⁴

5.4 MONITOREO GENETICO

El monitoreo genético involucra una serie de técnicas específicas mediante el uso de diferentes biomarcadores que reflejan la respuesta y susceptibilidad de exposiciones a agentes genotóxicos, permitiendo estimar el riesgo asociado con el fin de indicar acciones preventivas para reducir o eliminar sus efectos así como para fijar límites de exposición. Sin embargo, la única forma de definir el potencial carcinogénico de una sustancia es mediante la realización de estudios epidemiológicos. Los estudios epidemiológicos de monitoreo pueden realizarse en un menor periodo de tiempo, siendo posible definir los niveles y tiempos de exposición y el número de individuos expuestos; teniendo en cuenta las diversas fuentes de variación como el estilo de vida y condiciones generales de salud del individuo.¹⁴⁵ Dentro del proceso de monitoreo genético son muy importantes los ensayos citogenéticos, los cuales permiten detectar el daño

genético inicial en procesos neoplásicos con un valor predictivo de oncogenicidad del 60 al 90%, dependiendo de las características químicas de las sustancias, del tipo de prueba y del laboratorio que lo realiza.¹⁴⁷

5.5 DETERMINANTES SOCIALES DE LAS SALUD (DSS)

Son condiciones o circunstancias que hacen parte del bienestar, calidad de vida y desarrollo humano, que ejercen influencia sobre la salud de las personas y que actúan e interaccionan en diferentes niveles de organización determinando el estado de salud de la población.¹⁴⁸ La OMS establece que los Determinantes Sociales de la Salud (DSS) conforman un modelo que reconoce que el riesgo epidemiológico está determinado tanto individual, histórica, como socialmente. La relación entre los determinantes de la salud y el estado de salud, involucra muchos niveles de la sociedad que abarcan tanto el nivel micro celular como el macro ambiental.^{148,149} Los determinantes de salud se dividen en tres: **1)** estructurales o distales dentro de los que se encuentran las condiciones generales (género, etnia, edad), políticos, socioeconómicas, culturales y ambientales; **2)** intermedios como las influencias comunitarias, soporte social, acceso a servicios de atención en salud y condiciones de vida (vivienda, empleo y educación) y **3)** proximales o biológicos, factores individuales como el estilo de vida y caudal genético.³⁶

5.6 ENSAYO CITÓMICO

El Ensayo de Micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal comenzó a utilizarse en la década de los 80's, siendo Stich en 1983 el primero en proponerlo.⁵³ Recientemente se ha implementado el Ensayo Citómico, una técnica citogenética mínimamente invasiva, económica y eficaz que permite evaluar el efecto de las exposiciones mediante otras anomalías nucleares además de micronúcleos (MN), tales como brotes nucleares (BrN), células binucleadas (BN), células con cromatina condensada (Cc), células cariorréticas (Cr), células picnóticas (Pn) y células cariolíticas (Cl); por lo tanto, permite evaluar el daño genotóxico, citotóxico y muerte celular, así como el potencial de reparación y proliferación celular del epitelio bucal en estudios de poblaciones humanas. El significado biológico de los biomarcadores de muerte celular aún no se entiende completamente, aunque hay evidencia que sugiere una asociación entre estas y el envejecimiento prematuro, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Este método se utiliza cada vez más en los estudios epidemiológicos moleculares para investigar el impacto de exposiciones ambientales u ocupacionales, nutrición y factores de estilo de vida.¹⁵⁰⁻¹⁵² Mediante esta prueba se pueden evaluar los siguientes biomarcadores de efecto temprano:

5.6.1 Biomarcadores de genotoxicidad.

5.6.1.1 Micronúcleos (MN). Son cuerpos de ADN presentes en el citoplasma de células en interface con apariencia de pequeños núcleos. Estas estructuras pueden originarse tanto por compuestos clastogénicos que producen quiebres en el ADN formando fragmentos acéntricos cromatídicos o cromosómicos; como por compuestos aneugénicos que generan daños en el huso mitótico impidiendo que el cromosoma entero migre a los polos durante la anafase y se incorpore correctamente en el núcleo principal de las células hijas (**Anexo 1**).^{50,153} Estas estructuras son rodeadas por una membrana nuclear diferente durante la telofase, formando pequeños núcleos redondos u ovalados con una intensidad de tinción y textura similar al núcleo principal y un diámetro que oscila entre 1/3 y 1/16 del núcleo, a los que se les denomina Micronúcleos (**Fig. 3A-3C, 4A, 4B**).^{47,150,154-157} Estos eventos pueden ser inducidos por el estrés oxidativo, exposición a compuestos tóxicos, defectos genéticos en punto de control del ciclo

celular y/o genes de reparación del ADN, así como deficiencias en nutrientes, en cofactores del metabolismo del ADN y en la maquinaria de segregación cromosómica, reflejando inestabilidad genética propia de tejidos cancerosos.¹⁵⁸ Por lo tanto se consideran premonitores del desarrollo de procesos degenerativos celulares (Neoplasia),⁵³ debido a que se elevan típicamente en lesiones premalignas, que indican un aumento del riesgo de cáncer.⁴⁷

Los MN se han considerado como indicadores de daño en las células humanas y su principal ventaja es que se pueden registrar con relativa facilidad y en diferentes tipos de células tales como linfocitos, fibroblastos y células epiteliales, como la mucosa oral, nasal, urotelial, cervical y epidermis.^{47,154} Los MN en células exfoliadas emergen durante la mitosis de las capas basales del epitelio y se manifiesta en la capa superficial del tejido epitelial, identificando el daño en un intervalo de tiempo corto (**Fig. 5**).^{159,160}

5.6.1.2 Brotes nucleares (BrN). Son cuerpos nucleares que están conectados al núcleo principal por un puente nucleoplásmico delgado y presentan la misma textura e intensidad de tinción que el núcleo. Su diámetro por lo general oscila entre 1/2 y 1/16 del núcleo principal, pero en algunos casos más raros podrían ser incluso del mismo tamaño (huevos rotos) (**Fig. 3D, 3E, 4C**).¹⁵² Se ha sugerido que la formación de estas anomalías nucleares se lleva a cabo cuando el núcleo intenta eliminar el exceso de ADN amplificado mediante un proceso activo en donde se concentra la parte amplificada en una especie de minicélula o MN que posteriormente migra a la periferia del núcleo expulsándolo de este, salvo que queda vinculado por una protuberancia o una brecha de material nucleoplásmico dependiendo de la etapa en la que se encuentre la célula. Este proceso se produce durante la fase S del ciclo celular de las células basales y puede terminar en la formación de MN (**Fig. 5**). Los brotes nucleares se consideran un biomarcador de efecto temprano junto con los MNs.^{49,150,152,155}

5.6.2 Biomarcadores de citotoxicidad.

5.6.2.1 Células binucleadas (BN). Son células que tienen dos núcleos del mismo tamaño, morfología, textura e intensidad de tinción. A menudo están cerca y pueden entrar en contacto entre sí (**Fig. 3F, 3G, 4D**). El mecanismo más probable para la formación de células binucleadas es el fracaso de la citocinesis después de la finalización de la división nuclear de las células basales, ya sea por defectos en la formación del anillo de microfilamentos o por la detención del ciclo celular por fallas en la segregación de cromosomas (**Fig. 5**).^{150,152,161}

5.6.2.2 Células tri-polinucleadas (PN-TN). Este biomarcador no se encuentra en el epitelio bucal y hasta la fecha no se ha estudiado en el epitelio nasal, por lo cual no hay información pertinente respecto a su formación ni a los criterios de identificación; sin embargo, pudimos observar que estas células se caracterizan por presentar más de dos núcleos ocasionalmente de tamaño diferente y con una morfología, textura e intensidad de tinción igual. Debido al pequeño tamaño del citoplasma, los núcleos suelen entrar en contacto o solaparse (**Fig. 3H-3J**). Finalmente, creemos que estas células al igual que las células binucleadas se forman por fallas en la citocinesis.

5.6.3 Biomarcadores de muerte celular.

5.6.3.1 Células con cromatina condensada (Cc). Estas células se consideran una etapa temprana de la apoptosis aunque esto no se ha demostrado de manera concluyente.¹⁶² Se caracterizan por presentar núcleos angulares, de forma plana y con un patrón nuclear más o menos estriado, donde la cromatina condensada se agrupa en ciertas regiones del núcleo tiñéndose intensamente (**Fig. 4E**). Estas células, así como las células cariorréticas dan lugar a

núcleos fragmentados, que conduce a la eventual desintegración, y a veces parecen contener cuerpos similares a MN, pero estos no se cuentan puesto que su origen no ha sido determinado (Fig. 5).^{150,152,163}

5.6.3.2 Células cariorrécticas (Cr). Se caracterizan por tener el núcleo en proceso de desintegración con la cromatina menos visible que las con cromatina condensada. Su patrón nuclear densamente moteado es indicativo de la desintegración nuclear (Fig. 4F). Se sugiere que provienen de Cc y se consideran una etapa temprana de la apoptosis, pero esto no se ha demostrado de manera concluyente (Fig. 5).^{150,152,162,163}

5.6.3.3 Células picnóticas (Pn). Se caracterizan por tener un núcleo reducido y con una alta densidad de material nuclear que es uniformemente e intensamente coloreado y con un diámetro por lo general de 1/3 a 2/3 del núcleo de las células diferenciadas normales (Fig. 4G). Existen dos teorías de la formación de las células Picnóticas: **1)** proceden de las Cc y preceden a CI y **2)** pueden representar una única forma de muerte celular representando una alternativa en el mecanismo de desintegración nuclear distinta del proceso que conduce a la cromatina condensada y las cariorrécticas (Fig. 5). Se consideran una etapa tardía de la apoptosis.^{150,152,163}

5.6.3.4 Células cariolíticas (CI). Se caracterizan por presentar el núcleo totalmente desintegrado, observándose como imágenes fantasmales debido a que no presentan ADN (Feulgen-negativos) (Fig. 4H). Representan una etapa muy avanzada del proceso de muerte celular y se han asociado con la necrosis. Se presume que proceden de células Cc o Pn (Fig. 5).^{150,152,163}

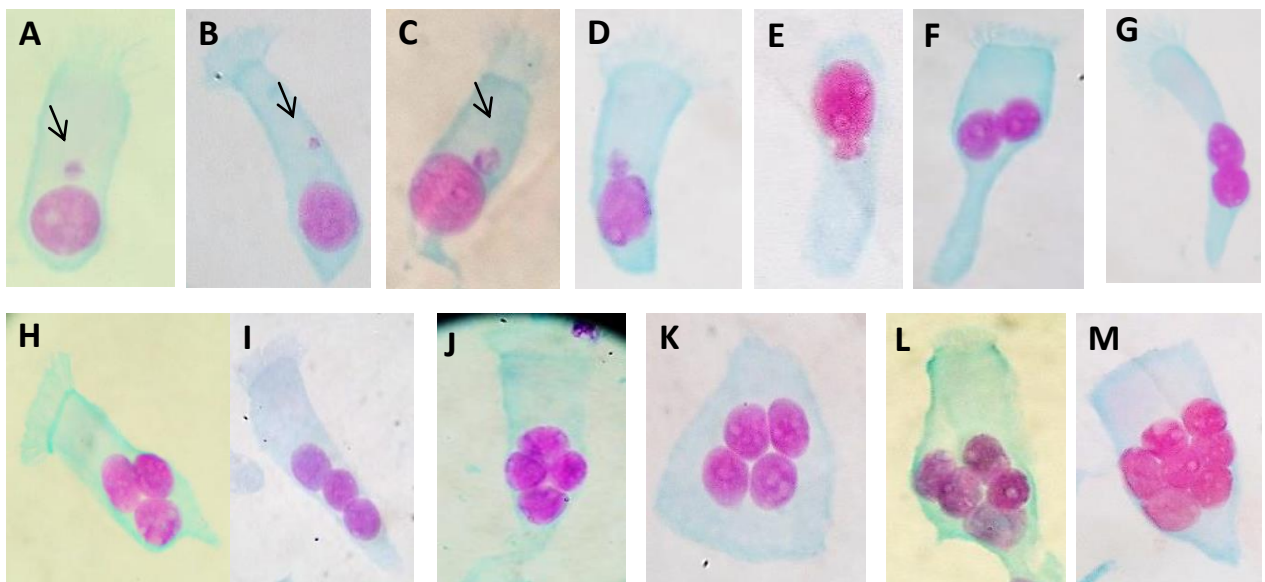


Figura 3. Biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad evaluados en células columnares del epitelio respiratorio pseudoestratificado nasal con un aumento de 100X. **A) – C)** Células con micronúcleo. **D) y E)** Células con brote nuclear. **F) y G)** Células binucleadas. **H) - M)** Células tri-polinucleadas. (Fuente propia)

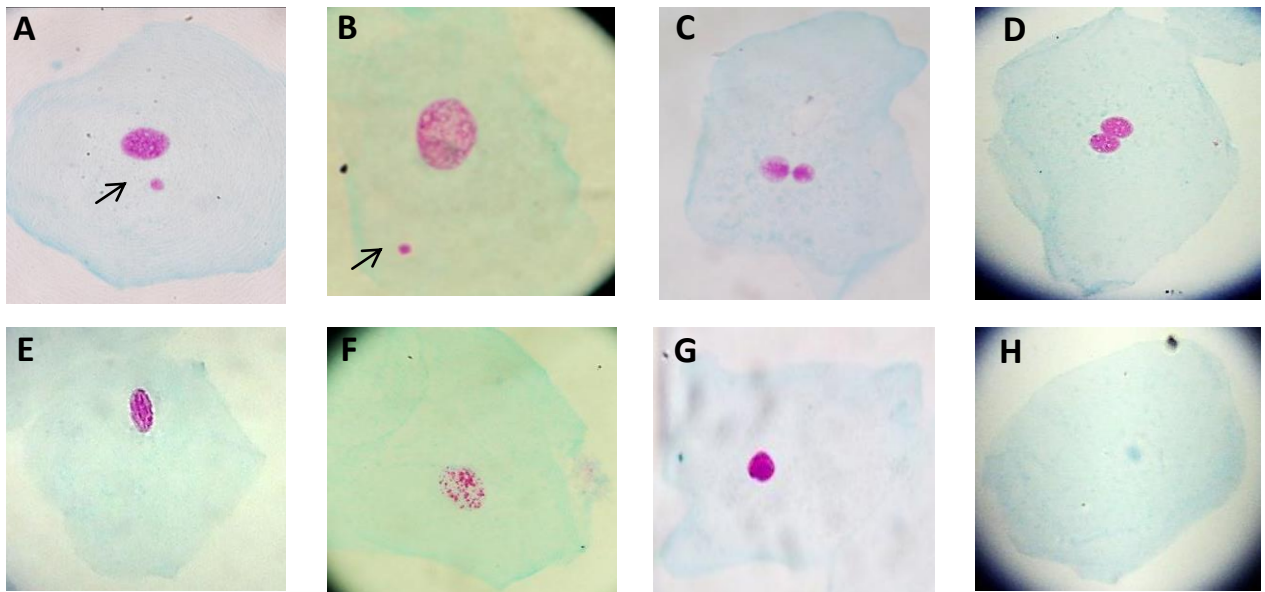


Figura 4. Biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad y muerte celular evaluados en células escamosas diferenciadas del epitelio bucal con un aumento de 100X. **A) y B)** Células con micronúcleo. **C)** Célula con brote nuclear. **D)** Célula binucleada. **E).** Célula con cromatina condensada **F)** Célula cariorrética. **G)** Célula picnótica. **H)** Célula cariolítica. (Fuente propia)

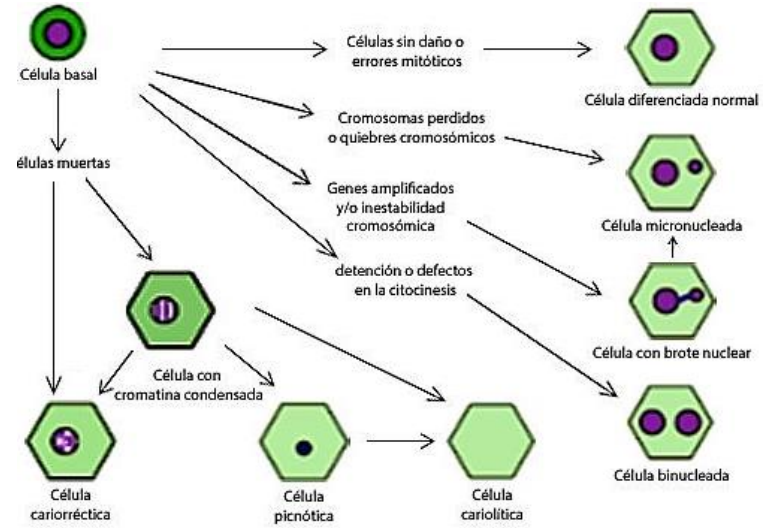


Figura 5. Modelo citotóxico bucal donde se muestra las relaciones celulares y los eventos de una célula basal a su posterior diferenciación, muerte celular y diferentes tipos de daño genético que pueden ocurrir. Modificado de Thomas *et al.* (2008) y Bolognesi *et al.* (2013).

5.6.4 Índice de reparación (IR). Es una medida que se obtiene a partir de los biomarcadores de genotoxicidad (MN y BrN) y de muerte celular (Cr y Cl), reflejando la dinámica de un tejido tras exposiciones ambientales u ocupacionales. Ramírez y Saldanha (2002) argumentan que las células cariorréticas y los brotes nucleares deben considerarse como etapas precursoras morfológicas de cariólisis y micronúcleos, por tanto un proceso degenerativo incluye la secuencia: BrN→MN→Cr→Cl. El índice de reparación muestra la dinámica de la homeostasis del tejido bucal hacia la degeneración: Clastogénesis→mutagénesis→carcinogénesis.^{96,164,165}

5.7 TEJIDO EPITELIAL

Es un tejido avascular que cubre o reviste todas las superficies, cavidades y tubos del organismo, se nutre por difusión a través de los capilares sanguíneos del tejido conectivo subyacente.^{166,167} En los tejidos epiteliales al igual que en muchos otros, los diferentes tipos de células ocupan lugares específicos, de este modo, las células diferenciadas se hallan en la capa superior del tejido, mientras que las células madre o indiferenciadas se hallan en la capa inferior.¹⁶⁸ Las células que forman el epitelio se caracterizan por estar estrechamente yuxtapuestas y se adhieren una a la otra por medio de moléculas específicas de adhesión célula a célula formando una barrera entre la superficie libre y el tejido conectivo adyacente.¹⁶⁷

Los epitelios se clasifican en *simples* cuando tienen una sola capa de células y todas están en contacto con el tejido conectivo; *estratificados* cuando tienen dos o más capas celulares superpuestas y la capa basal es la única que está en contacto con el tejido conectivo.¹⁶⁹ Por otra parte, reciben el nombre de *pseudoestratificados* aquellos epitelios en los cuales, si bien todas las células se apoyan sobre el tejido conectivo (de modo que son epitelios simples), algunas no llegan a la superficie pues varían en forma y altura y presentan núcleos escalonados, dando la falsa impresión de ser un epitelio estratificado.^{170,171} Igualmente, los epitelios se clasifican según la forma de sus células diferenciadas: *escamosas* cuando son planas con una superficie irregular y el ancho es mayor que su altura; *cúbicas* cuando el ancho, la profundidad, y la altura son aproximadamente iguales y presentan un núcleo esférico; y *columnares* cuando su altura es de 2 a 5 veces mayor que su anchura y poseen un núcleo generalmente ovoide.^{166,167,172}

5.7.1 Epitelio nasal. Según su ubicación podemos encontrar 3 tipos de epitelio en la cavidad nasal (**Fig. 6A**): **1) Epitelio vestibular**, caracterizado por ser estratificado escamoso y revestir la parte anterior de la cavidad nasal (**Fig. 6D**); **2) Epitelio respiratorio** o mucosa nasal, que se distingue por ser de tipo pseudoestratificado columnar y recubrir los cornetes y el septum, los cuales constituyen la mayor parte de la cavidad (**Fig. 6C**) y **3) Epitelio olfativo**, clasificado como pseudoestratificado columnar especializado debido a que presenta células sensitivas, ubicado en la zona posterior de la cavidad nasal.^{170,171,173} En este trabajo el efecto de la exposición se evaluó en el epitelio respiratorio nasal pseudoestratificado, el cual se encuentra en los revestimientos de las vías respiratorias, incluyendo bronquios, tráquea y la cavidad nasal. Este epitelio está compuesto por 3 tipos de células: **1) las células basales** o células madre que se encuentran en la parte inferior del epitelio y son las únicas que se reproducen con el fin de mantener una población adecuada de células columnares y caliciformes, y donde se generan los daños genotóxicos y citotóxicos (**Fig. 7A, 7B**); **2) las células caliciformes**, las cuales tienen forma de copa y se encargan de secretar moco sobre la superficie del epitelio como un mecanismo de protección (**Fig. 7E**) y **3) las células columnares ciliadas** son el tipo de células más prominente en este epitelio, se caracterizan por ser altas y poseer cilios activamente móviles cuya función es eliminar las partículas que ingresan con el aire inhalado (**Fig. 7C, 7D**).^{170,171}

La mucosa nasal tiene como función proteger al organismo de cuerpos extraños vivos e inertes mediante un proceso que tarda entre 10 y 20 minutos denominado “*escalera mucociliar*”. En este, la mucosidad y los cilios del epitelio respiratorio forman una cinta de transporte desde la cabeza del cornete inferior hasta la coana, eliminando las partículas atrapadas en el moco. El rendimiento óptimo de este sistema de depuración depende de múltiples factores como pH, temperatura, estado coloidal, humedad, amplitud de las fosas nasales y gases nocivos. Alteraciones de estos factores y de la composición de la mucosidad y de la actividad ciliar, pueden afectar seriamente la fisiología de las fosas nasales.¹²²

5.7.2 Epitelio bucal. La cavidad oral se encuentra recubierta por una mucosa que incluye un epitelio escamoso suprayacente y un tejido conectivo subyacente. La mucosa oral se divide en 3 de acuerdo a las diferencias en el recubrimiento epitelial y las funciones (**Fig. 6B**):¹²³ **1) mucosa masticatoria**, conformada por epitelio plano queratinizado y presente en las encías y en el paladar duro. **2) mucosa de revestimiento**, se encuentra, labios, mejillas, paladar blando, piso de la boca, superficie ventral de la lengua y de la mucosa alveolar; se caracteriza por ser epitelio no queratinizado, aunque en algunos sitios debido a la fricción de la masticación puede estar paraqueratinizado y **3) mucosa especializada** que se asocia con la sensación del gusto y se halla restringida en la superficie dorsal de la lengua.¹⁶⁷ En este trabajo el efecto de la exposición se evaluó en el epitelio de la mucosa bucal no queratinizado que recubre las mejillas. A diferencia del epitelio nasal respiratorio que está conformado por una sola capa celular y diversos tipos de células, este epitelio está conformado únicamente por células escamosas, distribuidas entre 40 y 50 capas que tardan de 7 a 21 en descamarse.^{174,175}

Este epitelio está compuesto por tres estratos celulares (**Fig. 6E**): **1) estrato basal o germinativo**, presenta células cuboides y con núcleos grandes en relación al citoplasma, son las únicas del epitelio que se reproducen y donde se generan los MN, BrN y BN, debido a que están en contacto directo con los compuestos genotóxicos y/o citotóxicos presentes en la sangre que pasan a través del tejido conectivo (**Fig. 7F**); **2) estrato espinoso**, constituido por varias capas de células diferenciadas con forma poligonal y núcleos redondos un poco más pequeños que los de los basales (**Fig. 7G, 7H**), se caracteriza por tener células en estadios tempranos de la apoptosis (Cc y Cr) y **3) Estrato granuloso o capa superficial de la mucosa**, conformado con células tardías de la apoptosis (Pn y Cl) que se caracterizan por presentar una forma plana.^{163,167,176}

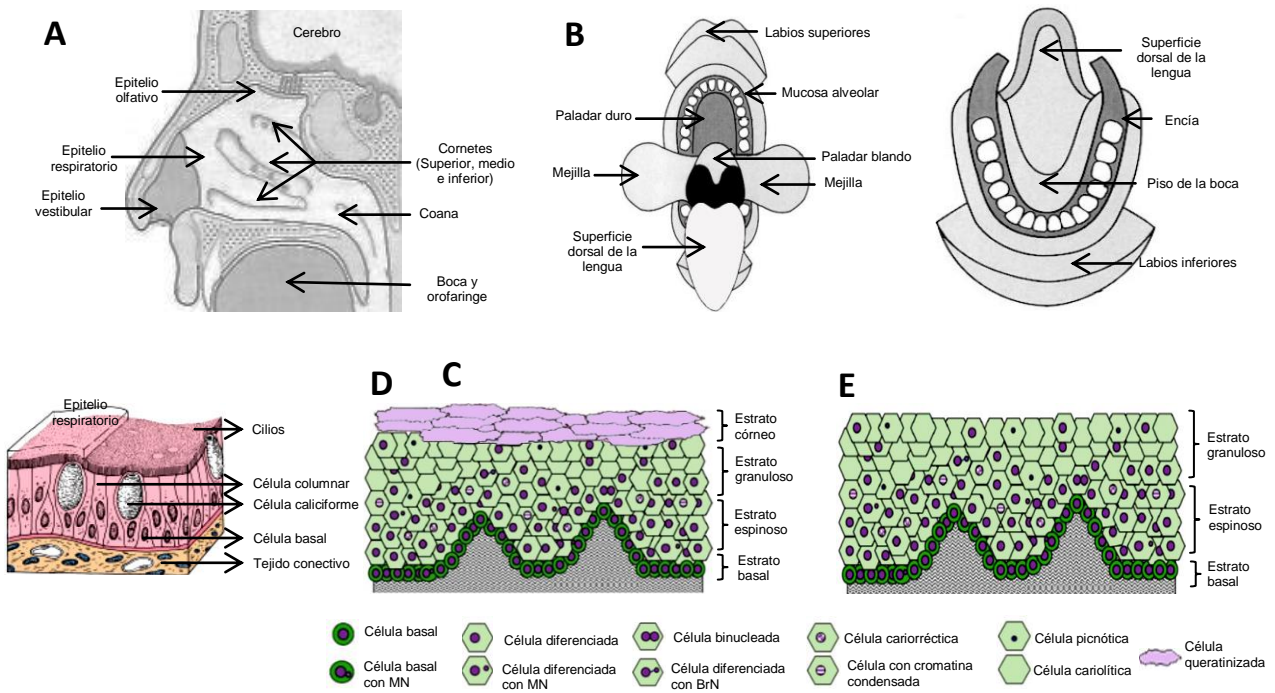


Figure 6. Anatomía e histología de las cavidades nasal y bucal. **A)** Corte sagital que muestra los epitelios que recubren la cavidad nasal, modificado de Stevens & Lowe (2006).¹⁶⁹ **B)** Diagrama que muestra la anatomía y extensión de las mucosas en la cavidad oral, modificado de Squier & Kremer, (2001).¹⁷⁷ **C)** Disposición de los diferentes tipos de células del epitelio respiratorio pseudoestratificado nasal, modificado de Ross & Pawlina (2011).¹⁶⁷ **D)** Disposición de las células del epitelio vestibular escamoso estratificado queratinizado nasal, modificado de Thomas *et al.* (2009).¹⁷⁶ **E)** Disposición de las células del epitelio escamoso estratificado no queratinizado bucal, modificado de Thomas *et al.* (2009).¹⁷⁶ En las figuras **D**) y **E**) se muestran las diferentes capas celulares y las posibles relaciones espaciales de los distintos tipos de células.¹⁷⁶

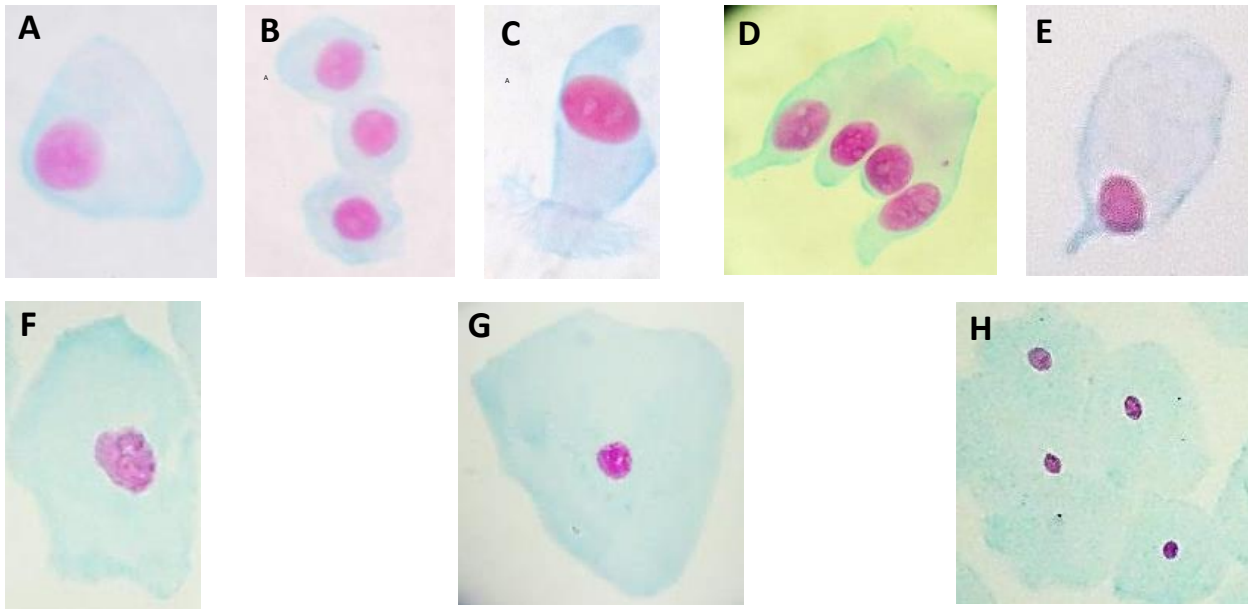


Figura 7. Células basales y diferenciadas de los epitelios nasal y bucal. **A)-E)** Células del epitelio respiratorio pseudoestratificado nasal: **A)** Célula basal. **B)** Células basales adheridas por uniones celulares. **C)** Célula columnar ciliada. **D)** Células columnares ciliadas adheridas por uniones celulares. **E)** Célula caliciforme. **F)-H)** Células del epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa bucal: **F)** Célula basal. **G)** Célula diferenciada. **H)** Disposición de las células diferenciadas en el epitelio bucal. (Fuente propia)

6. METODOLOGÍA

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se condujo un estudio de monitoreo genético, epidemiológico molecular de tipo transversal, descriptivo y observacional, mediante el cual se estableció la asociación entre la exposición al humo de leña y la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad empleando el Ensayo de Micronúcleos y otras anomalías nucleares en células de los epitelios nasal y bucal, en una muestra poblacional de mujeres expuestas de veredas aledañas a los municipios de Popayán y Timbío y en mujeres no expuestas. Este trabajo fue registrado ante Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca con ID 3688 (**Anexo 5**).

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La muestra poblacional fue de 140 mujeres (n=140) dividida en dos grupos: **1)** el grupo expuesto conformado por 70 mujeres que cocinan con leña y habitantes de las veredas Barro Plateado, Samanga, Clarete Alto y Figueroa del municipio de Popayán y las veredas Cinco Días y las Guacas del municipio de Timbío y **2)** el grupo referente, conformado por 70 mujeres no expuestas al humo de leña, pertenecientes a barrios periféricos de la ciudad de Popayán en donde se presenta menos polución en comparación al casco urbano.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo constituida por mujeres sanas y con un rango de edad comprendido entre los 18 y 65 años. En el grupo expuesto se incluyeron mujeres con un tiempo mínimo de exposición al humo de leña de 5 años y 1 hora diaria, y al grupo referente mujeres sanas y no expuestas al humo de leña.

Se excluyeron a mujeres fumadoras, consumidoras de alcohol y/o sustancias psicoactivas, dependientes de fármacos para el tratamiento del cáncer y expuestas a compuestos carcinogénicos. También se excluyeron mujeres que hubieran ingerido medicamentos fuertes 3 meses antes de la recolección de la muestra o que hubieran sido irradiadas en un lapso menor de 1 año.

6.4 RECOLECCIÓN DE DATOS

A través de una encuesta (**Anexo 3**) aplicada a la población de estudio, se obtuvo información relacionada a variables demográficas, dieta, afecciones respiratorias y estilo de vida que podrían modular la frecuencia de los biomarcadores (**Cuadro 3**). También se obtuvo información acerca del tiempo de exposición y mediante un estudio visual realizado en las viviendas de las mujeres expuestas, se categorizó las variables de infraestructura de la cocina:

1. La ubicación de la hornilla en la vivienda se clasificó al *Interior* cuando estaba dentro de la vivienda y al *Exterior* cuando se encontraba alejada de la casa pero no al aire libre (**Cuadro 3; Anexo 12**).

- La ventilación de la cocina se clasificó en: *escasa* cuando las cocinas tenían 4 paredes con delgadas aberturas y sin ventanas; *moderada* con 3 o 4 paredes separadas del techo con grandes aberturas, y *adecuada* con 1 o 2 paredes o con 4 paredes pero con más de 3 ventanas grandes (**Cuadro 3; Anexo 13**).
- El tipo de hornilla se clasificó en *cámara de combustión abierta*, estufas improvisadas con ladrillos laterales sin uniones permanentes y con rejillas que soportan las ollas; *cámara de combustión semicerrada*, estufas permanentes elaboradas con cemento en los laterales, parte superior y posterior de la cámara y con tan solo una abertura en la parte anterior para introducir la leña, y *cámara de combustión con chimenea*, con iguales características que la hornilla anterior pero con chimenea (**Cuadro 3; Anexo 14**).

De acuerdo con la información obtenida, los grupos expuesto y referente fueron apareados de acuerdo a la edad con una diferencia de ± 1 año y al nivel socioeconómico con el fin de disminuir el sesgo en el análisis estadístico.

Cuadro 3. Descripción de las variables analizadas en la población de estudio.

V A R I A B L E S	Independiente	Características de la población	
		Demografía <ul style="list-style-type: none"> Exposición al humo de leña: Grupo expuesto – Grupo referente Edad (rango): ≤ 40 - > 40 años (18 – 66) Índice de masa corporal Dieta <ul style="list-style-type: none"> Consumo de grasas: Bajo – Alto Consumo de carnes: Bajo – Alto Consumo de pescado: Bajo – Alto Consumo de frutas: Bajo – Alto Consumo de verduras: Bajo – Alto Afecciones respiratorias <ul style="list-style-type: none"> Rinitis: Si – No Sinusitis: Si – No Ardor en la garganta: Si – No Tos permanente: Si – No Resequedad en la boca: Si – No 	
		Características de la exposición e infraestructura de la cocina*	
	<ul style="list-style-type: none"> Años de exposición al humo de leña (rango): ≤ 36 - > 36 años (2 – 66) Horas diarias de exposición al humo de leña (rango): $\leq 4,5$ - $> 4,5$ horas (1 – 14) Ubicación de la cocina en la vivienda: Interior – Exterior Ventilación de la cocina: Escasa - Moderada – Adecuada Tipo de hornilla: Cámara de combustión abierta (C.C.A)- Cámara de combustión semicerrada (C.C.S.) - Cámara de combustión con chimenea (C.C.CH) Estilo de vida <ul style="list-style-type: none"> Exposición a plaguicidas: Si – No Actividad física: ≤ 7 - > 7 horas 		
Dependiente	Daño Genotóxico	Frecuencia de MN, BrN y Total de genotoxicidad	
	Daño Citotóxico	Frecuencia de BN, TN-PN y Total de citotoxicidad	
	Muerte celular	Frecuencia de Cc, Cr, Pn y Ci y Total de muerte celular	

* Factor exclusivo para grupo de mujeres expuestas al humo de biomasa.

6.5 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS Y OTRAS ANOMALÍAS NUCLEARES

Antes de la toma de las muestras de los epitelios nasal y bucal, y luego de conocer el propósito, los objetivos, y la metodología del estudio las mujeres vinculadas al proyecto firmaron voluntariamente el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca el cual otorgo el Aval Ético para la

realización de este proyecto (**Anexos 4 y 6**).

La obtención, procesamiento y tinción de las muestras del epitelio nasal no se detallará debido a que actualmente este protocolo está siendo evaluado por la oficina División de Articulación Con el Entorno de la Universidad del Cauca para ver si esta tecnología debe ser protegida para efectos de comercialización, según lo establecido en la legislación vigente en el país, el estatuto sobre propiedad intelectual expedido en el Acuerdo 008 del 22 de febrero de 1999 del Consejo Superior de la Universidad del Cauca, y las normas que lo modifiquen y complementen o en su defecto al compromiso de obtener como producto final la publicación de este protocolo.

6.5.1 Obtención de las muestras. Las muestras del epitelio nasal fueron tomadas bajo medidas de asepsia por las autoras del presente estudio luego de un largo aprendizaje enmarcado en el proceso de estandarización. Posteriormente las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. Debido a la complejidad y al tiempo requerido para la obtención de la suspensión celular y su posterior análisis en el microscopio óptico, sólo se muestrearon 5 mujeres por día.

Para la toma de las muestras del epitelio bucal, se les indicó a las mujeres no ingerir ningún tipo de alimento 1 hora previa al muestreo y presentarse con una buena higiene bucal. Las muestras se obtuvieron realizando movimientos circulares en la cara interna de las mejillas con un cepillo citológico nuevo y estéril y se depositaron en solución salina al 0.9%. A cada muestra se le agregó 3 ml de fijador Saccomanno y se preservaron en una nevera a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, donde se procesaron de acuerdo al protocolo modificado de Tolbert.¹⁷⁸

6.5.2 Procesamiento de las muestras y tinción. Las muestras tomadas del epitelio bucal se sometieron a 4 lavados realizando los siguientes pasos en cada uno: La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1200 rpm en un intervalo de 5 minutos, luego se removió completamente el sobrenadante conservando el botón celular, al cual se le agregaron 4 mL de solución salina estéril al 0.9% y 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), procediendo a pipetear durante 5 minutos con el fin de separar cada célula y eliminar los tejidos. En cada lavado se repitió este procedimiento disminuyendo el volumen de DMSO en 10 µL. Finalmente se retiró el sobrenadante y se agregó metanol al 80% de acuerdo a la concentración celular para obtener una suspensión de densidad adecuada. Las preparaciones citológicas se realizaron mediante un extendido uniforme y se secaron al aire a temperatura ambiente por un espacio de 24 horas y posteriormente fijadas en metanol al 80% durante 20 minutos. Después de 5 días se realizó la tinción específica para el ADN bajo el protocolo de Feulgen,¹⁷⁹ en el cual las preparaciones citológicas fueron sometidas a un proceso de hidratación celular en alcoholes del 50%, 20% y finalmente en agua destilada. Luego se introdujeron en HCl al 5M el cual genera una hidrólisis ácida que rompe los puentes de hidrógeno permitiendo la desnaturalización del ADN y la liberación de las bases purínicas (A y G), de esta forma se producen grupos aldehído quienes reaccionan finalmente con el colorante Schiff tiñendo el núcleo de color fucsia magenta. Finalmente, las preparaciones citológicas se sumergen en el colorante Fast Green tiñendo el citoplasma de color verde manzana dando contraste a la tinción.

6.5.3 Conteo y registro de biomarcadores. Luego de codificar las placas aleatoriamente con un ciego, se realizó la lectura de las mismas en un microscopio óptico con un objetivo de 40X; para la verificación y registro fotográfico de los biomarcadores observados se utilizó un objetivo de 100X. La identificación y clasificación de los biomarcadores, se realizó según los criterios Thomas *et al.* (2009) (ver punto 5.6). El método de conteo de los biomarcadores se hizo según lo estipulado en el “Buccal micronucleus cytome assay”¹⁷⁶:

- Epitelio nasal: El conteo se realizó únicamente en células columnares del epitelio respiratorio nasal. Se registró el número de BN y TN–PN por cada 1.000 células analizadas diferenciadas y número de MN y BrN en 2.000 células diferenciadas sin ninguna otra anomalía nuclear.
- Epitelio bucal: El conteo se realizó únicamente en células escamosas de la cara interna de las mejillas. Se registró el número de células Cc, Cr, Pn, CI y BN por cada 1.000 células analizadas diferenciadas y número de MN y BrN en 2.000 células diferenciadas sin ninguna otra anomalía nuclear. Con las frecuencias halladas de los biomarcadores se calculó el IR $(CI + Cr / MN + BrN)$.

Los datos obtenidos durante el conteo fueron registrados en un formato de lectura (**Anexos 7**) y para el análisis estadístico todos los biomarcadores se reportaron en 1000 células.

6.6 MANEJO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información obtenida a través de la encuesta y registrada en los formatos de lectura, se organizó en una base de datos de Excel y posteriormente fue sistematizada y analizada utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL). Este trabajo tuvo un nivel de significancia del 0,05 y una potencia de la prueba del 95%.

Para el análisis descriptivo de las características demográficas de la población de estudio y de la exposición al humo de leña se aplicó la prueba de Chi Cuadrado (χ^2) para variables cualitativas y la prueba paramétrica de t-Student para cuantitativas.

La frecuencia de los biomarcadores no se ajustó a la distribución normal (prueba de Kolmogorov) ni a la homogeneidad de varianza (prueba de Levene), por lo cual para el cumplimiento del primer y segundo objetivo de evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los epitelios nasal y bucal, se compararon los grupos de estudio en relación a las frecuencias de los biomarcadores aplicando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y para la obtención de medias la prueba paramétrica de t-Student.

Para comparar la sensibilidad entre los epitelios nasal y bucal frente a la exposición al humo de leña y cumplir con el tercer objetivo, se aplicó una prueba de t-Student para muestras relacionadas.

Cumpliendo con el cuarto objetivo, se implementó un análisis de correlación mediante pruebas de Regresión Lineal Simple y de Estimación Curvilínea entre la frecuencia de los biomarcadores con estos mismos y con otras variables cuantitativas (edad, años de exposición y horas diarias de exposición al humo de leña e IMC). Adicionalmente, la edad, los años y las horas de exposición, se categorizaron en dos rangos y se analizaron de forma cualitativa mediante las pruebas de t-Student y U de Mann-Whitney.

Para identificar el efecto del humo de leña sobre la frecuencia de los biomarcadores y su interacción con variables cualitativas importantes de la exposición, como ubicación de la hornilla en la vivienda, ventilación de la cocina y tipo de hornilla, se realizaron las pruebas de t-Student y U de Mann-Whitney para variables con dos categorías y ANOVA factorial y H de Kruskal-Wallis para variables con tres categorías. El efecto de la interacción de dos variables cualitativas de la exposición sobre la frecuencia de los biomarcadores, se evaluó mediante las pruebas de ANOVA factorial y U de Mann-Whitney.

Finalmente para conocer si hay relación entre los grupos de estudio (exposición o no al humo de leña) y dieta (consumo de, pescado, frutas y verduras), se aplicaron las pruebas de ANOVA factorial y U de Mann-Whitney.

6.7 SOCIALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Mediante charlas informativas se socializaron los resultados a nivel poblacional a las comunidades campesinas de las veredas que participaron en este proyecto y se les alertó sobre la gran problemática de salud que representa esta exposición, dándoles a conocer las enfermedades que se derivan de una exposición prolongada al humo de leña. Igualmente se les indicó medidas de prevención y formas sencillas para disminuir el nivel de exposición al humo de leña tales como el uso de tapabocas y limpieza permanente de las paredes del lugar donde se ubica la hornilla. Además se les mencionó algunos cambios que se pueden realizar en la infraestructura de la vivienda para disminuir el impacto de la exposición sobre la salud, como la implementación de chimeneas en las hornillas, el mejoramiento de la ventilación si se poseen hornillas sin chimenea y la ubicación de la cocina a una distancia prudente de la vivienda.

Así mismo se les informó de las ventajas de utilizar otros tipos de energías renovables y limpias como la energía eólica, hidráulica y solar, a través de molinos de viento, de agua y paneles solares respectivamente. Se les incentivó al desarrollo de iniciativas de proyectos que busquen la participación y el apoyo gubernamental para suplir estas necesidades y estas alternativas de energía; al igual que el impacto que genera la deforestación sobre los ecosistemas y cómo esto puede afectar la calidad de vida de los individuos.

Por otro lado, se socializaron los resultados del proyecto a la gerencia de la Clínica la Estancia S.A. de Popayán, quien aportó los insumos para la realización de este proyecto y a la comunidad médica que colaboró en la estandarización de las técnicas (Otorrinolaringólogos) como a los demás profesionales de salud que les interesó la temática (Patólogos).

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La **tabla 1** muestra las características demográficas de la población objeto de estudio, conformada por mujeres mestizas, del Suroccidente Colombiano y habitantes de zonas rurales cercanas a los municipios de Popayán y Timbío, Cauca. Los grupos referente y expuesto estuvieron conformados por 70 mujeres cada uno ($n=140$) y fueron emparejados por edad con una diferencia de ± 1 año. La edad promedio de las mujeres fue de 44,7 años para ambos grupos, encontrándose una diferencia no significativa de $p=0,998$. Para posteriores análisis estadísticos cualitativos, la edad se categorizó en dos rangos: ≤ 40 y >40 años presentándose una diferencia no significativa entre estas ($p=0,863$); dicha categorización se hizo teniendo en cuenta la media y el número de individuos estudiados.

El análisis comparativo de las variables entre los grupos de estudio manifestó una diferencia no significativa en el índice de masa corporal (IMC) ($p=0,127$) y la ingesta de grasas ($p=0,610$) y carnes rojas ($p=0,122$). Por otro lado, más del 70% del grupo expuesto presentó un bajo consumo de pescado, frutas y verduras, mientras que en el grupo referente más del 60% mostró un alto consumo de estos alimentos ($p=0,000$).

Respecto al análisis de las condiciones de salud, el grupo expuesto mostró una mayor frecuencia de todas las alteraciones respiratorias, encontrándose diferencias significativas en rinitis ($p=0,000$) y resequedad en la boca ($p=0,020$), al contrario de condiciones de salud como sinusitis ($p=0,654$), ardor de garganta ($p=0,664$) y tos permanente ($p=0,084$).

A través de la encuesta se obtuvo información acerca de variables como nivel de educación, estrato socioeconómico, tipo de biomasa empleada, tipo de leña, antecedentes familiares de salud y otras afecciones respiratorias (datos no mostrados) que no fueron analizados estadísticamente por las siguientes razones: **1) Ausencia de variabilidad dentro de la población:** El nivel de educación de la mayoría de las mujeres tanto expuestas como referentes fue hasta primaria, su estrato socioeconómico fue 1 y el único tipo de biomasa empleada fue la leña. **2) Alta variabilidad:** El tipo de leña no fue posible analizarlo, ya que cada mujer empleaba entre 4 y 5 especies arbustivas (Pino, Eucalipto, Guayabo, Roble, Café entre otras). **3) Baja frecuencia:** muy pocas mujeres manifestaron antecedentes familiares relacionados con la salud como EPOC, enfermedades respiratorias y cáncer en las vías aéreas superiores e inferiores, y otras afecciones respiratorias como irritación, obstrucción y hemorragia nasal, entre otras.

Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.

Variables	Referentes		Expuestos		P
	Nº (%)	Media ± D.E	Nº (%)	Media ± D.E	
Sujetos	70 (100)	N.A	70 (100)	N.A	N.A
Población latina (mestizos)	70 (100)	N.A	70 (100)	N.A	N.A
Edad en años (rango: 18 – 66 años)	70 (100)	44,70 ± 1,57	70 (100)	44,70 ± 1,58	0,998*
Edad Categorizada ≤ 40	27 (38,6)	N.A	29 (41,4)	N.A	0,863**
>40	43 (61,4)		41 (58,6)		
Índice de masa corporal (Kg/cm²)	70 (100)	24,61 ± 3,62	70 (100)	25,71 ± 3,62	0,127*
Dieta	N	%	N	%	
Grasas (frecuencia semanal)					
Bajo (≤ 7)	33	47,1	30	42,9	0,610**
Alto (>7)	37	52,9	40	57,1	
Carnes rojas (porciones semanales)					
Bajo (≤ 3)	46	65,7	36	51,4	0,122**
Alto (>3)	24	34,3	34	48,6	
Pescado					
Nunca	25	35,7	55	78,6	0,000**
Semanalmente	45	64,3	15	21,4	
Frutas (porciones semanales)					
Bajo (≤ 3)	20	28,6	55	78,6	0,000**
Alto (>3)	50	71,4	15	21,4	
Verduras (porciones semanales)					
Bajo (≤ 5)	28	40	50	71,4	0,000**
Alto (>5)	42	60	20	28,6	
Afecciones respiratorias					
Rinitis					
Si	24	34,3	5	7,1	0,000**
No	46	65,7	65	92,9	
Sinusitis					
Si	11	15,7	13	18,6	0,654**
No	59	84,3	57	81,4	
Ardor en la garganta					
Si	12	17,1	14	20	0,664**
No	58	82,9	56	80	
Tos permanente					
Si	6	8,6	13	18,6	0,084**
No	64	91,4	57	81,4	
Resequedad en la boca					
Si	6	8,6	16	22,9	0,020**
No	64	91,4	54	77,1	

*t - Student para la obtención de medias y D.E.

**Chi cuadrado de Person para la obtención de frecuencias.

N= Número de sujetos; **D.E**= Desviación estándar; **N.A**= No aplica.

p= Diferencia significativa entre los grupos referente y expuesto.

7.2 CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN E INFRAESTRUCTURA DE LA COCINA

El total de las mujeres del grupo expuesto empleaban únicamente leña para la cocción de sus alimentos. En la **tabla 2**, se observa que el promedio de la exposición al humo de leña fue de 35,86±2,20 años y el 51,4% de la población ha cocinado con leña por más de 36 años. Así mismo, el promedio de la exposición diaria al humo de leña fue de 4,87±2,61 horas, y se encontró que el 60% de las mujeres están expuestas más de 4,5 horas al día.

En cuanto a la infraestructura de la cocina, se estableció que el 48,6% de las viviendas estudiadas tenían la hornilla ubicada al exterior mientras que el 51,4% al interior. Se halló que el 50% de las viviendas poseen una cocina con escasa ventilación, el 27,1% moderada y el 22,9% adecuada. El tipo de hornilla en las viviendas, se clasificó en 3 categorías presentando cada una los siguientes porcentajes: el 50% de las viviendas poseían hornillas con cámara de combustión abierta (C.C.A), el 21,4% con cámara de combustión semicerrada (C.C.S.) y 27,1% con cámara de combustión con chimenea (C.C.CH).

Debido al estilo de vida de las mujeres expuestas, no fue posible usar como criterio de

exclusión la exposición a plaguicidas, observándose que el 20% de las mujeres expuestas utilizan estas sustancias y el 80% no hacen uso de estas. También se indagó sobre la actividad física, la cual se evaluó por el número de horas que las mujeres expuestas caminan semanalmente, encontrándose que el 61,4% acostumbra a caminar menos de 7 horas semanales y el 38,6% más de 7.

Tabla 2. Características de la exposición e infraestructura de la cocina.

Variables	Expuestos	
	N	%
Años de exposición (rango: 5- 66 años)		
≤ 36	34	48,6
>36	36	51,4
N (%) / Media ± D.E	70 (100)	35,86 ± 2,20*
Horas diarias de exposición (rango: 1-14 horas)		
≤ 4,5	28	40
>4,5	42	60
N (%) / Media ± D.E	70 (100)	4,87 ± 2,61*
Ubicación de la hornilla en la vivienda		
Interior	36	51,4
Exterior	34	48,6
Ventilación de la cocina		
Escasa	35	50,0
Moderada	19	27,1
Adecuada	16	22,9
Tipo de hornilla		
Cámara de combustión abierta	35	50,0
Cámara de combustión semicerrada	15	21,4
Cámara de combustión con chimenea	20	28,6
Estilo de vida		
Exposición a plaguicidas		
Si	14	20,0
No	56	80,0
Actividad física (horas semanales)		
≤ 7	43	61,4
>7	27	38,6

*t - Student para la obtención de medias y D.E.

Estadísticos descriptivos para frecuencias.

N= Número de sujetos; D.E= Desviación estándar.

7.3 COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO Y ENTRE LOS EPITELIOS NASAL Y BUCAL

7.3.1 Comparación entre los grupos de estudio. Los biomarcadores analizados en este estudio se muestran en la **tabla 3**. En el epitelio nasal se midieron 4 biomarcadores citogenéticos: 2 de genotoxicidad (micronúcleos (MN) y brotes nucleares (BrN)) y 2 de citotoxicidad (binucleadas (BN) y tri-polinucleadas (TN-PN)); lo anterior permitió analizar el total de genotoxicidad (TG) equivalente a la suma de MN + BrN y el total de citotoxicidad (TC) equivalente a la suma de BN + TN-PN. En este epitelio no son observables los biomarcadores de muerte celular.

En el epitelio nasal, la frecuencia de MN ($1,14 \pm 0,86$), BrN ($3,14 \pm 1,93$) y BN ($3,17 \pm 2,17$) aumentó significativamente ($p=0,000$) en un 518%, 532% y 67% en el grupo expuesto en comparación al grupo referente (MN: $0,22 \pm 0,34$; BrN: $0,59 \pm 0,59$; BN $1,90 \pm 1,36$). Por el contrario, las células TN-PN disminuyeron en un 36% en el grupo expuesto aunque no significativamente ($p=0,277$). Tanto el TG como el TC incrementaron significativamente en un 528% y 52% en el grupo expuesto en comparación al referente ($p<0,01$), siendo mayor la media de TG que la de TC en expuestos ($4,28 \pm 2,29$; $3,39 \pm 2,37$) y el TC mayor que el TG en referentes ($0,81 \pm 0,63$; $2,23 \pm 1,75$).

En el epitelio bucal se evaluaron 7 biomarcadores citogenéticos: 2 de genotoxicidad (MN y BrN), 1 de citotoxicidad (BN) y 4 de muerte celular (cromatina condensada (Cc), cariorrécticas (Cr), picnóticas (Pn) y cariolíticas (Cl). Se evaluó también el TG, el total de muerte celular (TMC) equivalente a la suma de Cc+Cr+Pn+Cl e índice de reparación (IR) equivalente a Cl+Cr/MN+BrN.¹⁶⁴ A diferencia del epitelio nasal, no se ha observado la presencia de células tri-polinucleadas.

El biomarcador MN tuvo una frecuencia de $0,36 \pm 0,56$ y el de BrN de $1,16 \pm 1,13$ siendo 1200% y 483% mayor en el grupo expuesto comparado con el grupo referente (MN= $0,03 \pm 0,12$; BrN= $0,24 \pm 0,34$), con una significancia de $p=0,000$. Los biomarcadores BN y Cr presentaron una diferencia significativa de $p<0,05$, con un aumento del 29% y 31% en el grupo expuesto. Las frecuencias de los biomarcadores Cc, Pn y Cl aumentaron en un 0,9 %,28% y 8% en el grupo expuesto en relación al grupo referente, aunque esta diferencia no fue significativa. El grupo expuesto presentó un mayor IR de $90,35 \pm 100,98$ en relación al grupo referente (IR: $60,77 \pm 91,61$) con una diferencia significativa de $p=0,000$. El TG aumentó 588% y el TMC 18% en expuestos en relación al grupo referente, con una significancia de $p=0,000$ y $p=0,027$ respectivamente.

Tabla 3. Comparación de las frecuencias de los biomarcadores entre el grupo referente y el grupo expuesto.

Biomarcadores (N°/ 1000 células)	Rango poblacional	Referentes	Expuestos	p*
		Media ± D. E	Media ± D. E	
Epitelio nasal				
Biomarcadores de genotoxicidad				
Micronúcleos (MN)	0 - 3,5	0,22 ± 0,34	1,14 ± 0,86	0,000
Brotos (BrN)	0 - 9,0	0,59 ± 0,59	3,14 ± 1,93	0,000
Total de genotoxicidad (MN + BrN) (TG)	0 - 10,5	0,81 ± 0,63	4,28 ± 2,29	0,000
Biomarcadores de citotoxicidad				
Binucleadas (BN)	0 - 9,0	1,90 ± 1,36	3,17 ± 2,17	0,000
Tri - Polinucleadas (TN - PN)	0 - 4,0	0,33 ± 0,72	0,21 ± 0,59	0,277
Total de citotoxicidad (BN + TN - PN) (TC)	0 - 10	2,23 ± 1,75	3,39 ± 2,37	0,002
Epitelio bucal				
Biomarcadores de genotoxicidad				
Micronúcleos (MN)	0 - 2,5	0,03 ± 0,12	0,36 ± 0,56	0,000
Brotos (BrN)	0 - 8,0	0,24 ± 0,34	1,16 ± 1,13	0,000
Total de genotoxicidad (MN + BrN) (TG)	0 - 8,5	0,26 ± 0,34	1,53 ± 1,32	0,000
Biomarcadores de citotoxicidad				
Binucleadas(BN)	0 - 17	3,26 ± 2,29	4,20 ± 2,87	0,012
Biomarcadores de Muerte celular				
Cromatina condensada (Cc)	0 - 66	19,46 ± 15,47	19,64 ± 15,14	0,869
Cariorrécticas (Cr)	0 - 122	39,03 ± 32,51	51,23 ± 33,72	0,017
Picnóticas (Pn)	0 - 91	17,84 ± 12,43	22,76 ± 19,93	0,420
Cariolíticas (Cl)	3 - 184	37,03 ± 31,58	39,86 ± 34,06	0,697
Total de muerte celular (Cc + Cr+ Pn+ Cl) (TMC)	16 - 311	113,36 ± 57,42	133,49 ± 59,23	0,027
Índice				
Índice de reparación (Cl + Cr / MN + BrN) (IR)	0 - 522	60,77 ± 91,61	90,35 ± 100,98	0,000

*U de Mann-Whitney; D.E= Desviación estándar.

p= Diferencia significativa entre los grupos referente y expuesto.

7.3.2 Comparación entre los epitelios nasal y bucal. El epitelio nasal tuvo 317% más MN y 271% más BrN que el bucal en el grupo expuesto al igual que el grupo referente con 733% más MN y 246% más BrN, con una diferencia altamente significativa de $p=0,000$. Por el contrario, el epitelio bucal presentó una frecuencia mayor de BN, en el cual el grupo expuesto registró 32% más y el referente 72% ($p=0,034$ y $p=0,00$) (tabla 4).

Tabla 4. Comparación de las frecuencias de los biomarcadores entre los epitelios nasal y bucal

Biomarcadores (N°/ 1000 células)	Epitelio nasal	Epitelio bucal	p*
	Media ± D.E	Media ± D.E	
Expuestos			
Micronúcleos (MN)	1,14 ± 0,86	0,36 ± 0,56	0,000
Brotos (BrN)	3,14 ± 1,93	1,16 ± 1,13	0,000
Total de genotoxicidad (MN + BrN)	4,28 ± 2,29	1,53 ± 1,32	0,000
Binucleadas (BN)	3,17 ± 2,17	4,20 ± 2,87	0,034
Referentes			
Micronúcleos(MN)	0,22 ± 0,34	0,03 ± 0,12	0,000
Brotos(BrN)	0,59 ± 0,59	0,24 ± 0,34	0,000
Total de genotoxicidad (MN + BrN)	0,81 ± 0,63	0,26 ± 0,34	0,000
Binucleadas (BN)	1,90 ± 1,36	3,26 ± 2,29	0,000

*t - Student para muestras relacionadas.

D.E= Desviación estándar.

p= Diferencia significativa entre los epitelios nasal y bucal.

7.4 FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES EN RELACIÓN A LA EDAD, TIEMPO DE EXPOSICIÓN, TIPO DE HORNILLA, UBICACIÓN Y VENTILACIÓN DE LA COCINA

Nuestros resultados expresan que en el epitelio nasal la frecuencia de los biomarcadores no se ve afectada si las mujeres son menores o mayores de 40 años en grupo expuesto. Del mismo modo, no se registraron diferencias significativas en los biomarcadores evaluados en las variables años y horas diarias de exposición al humo de leña, ubicación de la hornilla en la vivienda y actividad física; mientras que la escasa ventilación en la cocina y la hornilla abierta, aumentaron de manera significativa la frecuencia de MN ($p=0,025$) y BrN ($p=0,055$) respectivamente (**tabla 5**).

En el epitelio bucal, no hallamos diferencias significativas en el grupo expuesto entre menores y mayores de 40 años en los biomarcadores evaluados. Sin embargo, un tiempo de exposición al humo de leña mayor a 36 años aumentó significativamente la media de BN ($p=0,056$) y disminuyó significativamente las frecuencias del biomarcador Cr ($p=0,039$) en comparación a una exposición menor a 36 años. Contrariamente, las horas diarias de exposición al humo de leña, no afectaron la frecuencia de los biomarcadores. Las hornilla al interior de la vivienda produjo un aumento marginalmente significativo en la frecuencia de CI ($p=0,063$) y una escasa ventilación en las cocinas aumentó significativamente el biomarcador MN ($p=0,036$), en comparación con una moderada ventilación. Las hornillas con cámara de combustión abierta, causaron un aumento marginalmente significativo de la frecuencia de BrN, en comparación a hornillas con chimenea ($p=0,033$). Se determinó que caminar más de 7 horas semanales aumenta significativamente la frecuencia de BrN ($p=0,003$) (**tabla 6**).

Tabla 5. Frecuencias de los biomarcadores en relación a la edad, tiempo de exposición, tipo de hornilla, ubicación y ventilación de la cocina en el epitelio nasal.

Variables	Biomarcadores de genotoxicidad						Biomarcadores de citotoxicidad					
	C	MN		BrN		TG	BN		TN-PN		TC	
		Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	
Grupo referente		0,22 ± 0,34		0,59 ± 0,59		0,81 ± 0,63		1,90 ± 1,36		0,33 ± 0,72		2,23 ± 1,75
Años de exposición °												
≤ 36	1	1,10 ± 0,95 ^x		2,81 ± 1,57 ^x		3,91 ± 2,08 ^x		2,88 ± 1,90 ^x		0,12 ± 0,33		3,00 ± 2,10 ^x
>36	2	1,18 ± 0,79 ^x		3,44 ± 2,19 ^x		4,63 ± 2,46 ^x		3,44 ± 2,40 ^x		0,31 ± 0,75		3,75 ± 2,58 ^x
Horas de exposición °												
≤ 4,5	1	1,02 ± 1,00 ^x		3,11 ± 1,72 ^x		4,13 ± 2,15 ^x		3,21 ± 1,75 ^x		0,25 ± 0,80		3,46 ± 1,99 ^x
>4,5	2	1,23 ± 0,77 ^x		3,15 ± 2,08 ^x		4,38 ± 2,40 ^x		3,14 ± 2,44 ^x		0,19 ± 0,40		3,33 ± 2,62 ^x
Ubicación de la hornilla en la vivienda °												
Interior	1	1,28 ± 0,76 ^x		3,31 ± 1,93 ^x		4,58 ± 2,11 ^x		3,31 ± 2,15 ^x		0,25 ± 0,73		3,56 ± 2,36 ^x
Exterior	2	1,00 ± 0,95 ^x		2,96 ± 1,94 ^x		3,96 ± 2,46 ^x		3,03 ± 2,22 ^x		0,18 ± 0,39		3,21 ± 2,41 ^x
Ventilación de la cocina °°												
Escasa	1	1,39 ± 0,82 ^x		3,36 ± 1,81 ^x		4,74 ± 1,99 ^x		2,86 ± 2,33		0,14 ± 0,36		3,00 ± 2,47
Moderada	2	0,74 ± 0,61 ^x	a*	2,84 ± 2,14 ^x		3,58 ± 2,42 ^x	a**	3,26 ± 2,10 ^x		0,16 ± 0,38		3,42 ± 2,14 ^x
Adecuada	3	1,09 ± 1,05 ^x		3,00 ± 1,99 ^x		4,09 ± 2,65 ^x		3,75 ± 1,88 ^x		0,44 ± 1,03		4,19 ± 2,34 ^x
Tipo de hornilla °°												
C.C.A.	1	1,21 ± 0,85 ^x		3,63 ± 2,05 ^x		4,84 ± 2,46 ^x		2,89 ± 2,04 ^x		0,23 ± 0,73		3,11 ± 2,27 ^x
C.C.S	2	0,97 ± 0,69 ^x		2,40 ± 2,09 ^x	a**	3,37 ± 2,18 ^x	a**	3,73 ± 2,63 ^x		0,27 ± 0,46		4,00 ± 2,80 ^x
C.C.CH	3	1,15 ± 1,01 ^x		2,83 ± 1,35 ^x		3,98 ± 1,85 ^x		3,25 ± 2,05 ^x		0,15 ± 0,37		3,40 ± 2,23 ^x
Actividad física (h / semanales) °												
≤ 7	1	1,14 ± 0,92 ^x		3,11 ± 1,93 ^x		4,24 ± 2,31 ^x		3,05 ± 1,98 ^x		0,26 ± 0,69		3,30 ± 2,26 ^x
>7	2	1,15 ± 0,78 ^x		3,19 ± 1,96 ^x		4,33 ± 2,30 ^x		3,37 ± 2,48 ^x		0,15 ± 0,36		3,52 ± 2,58 ^x

° U de Mann-Whitney para significancias; t de Student para la obtención de medias y D.E.

°° H de Kruskal-Wallis para significancias; Anova de un factor para la obtención de medias y D.E.

C= Categorías. D.E= Desviación estándar.

MN= Micronúcleo; BrN= Brote nuclear; TG= Total de genotoxicidad; BN= Binucleada; TN – PN= Tri-polinucleada; TC= Total de citotoxicidad.

C.C.A= Cámara de combustión abierta; C.C.S= Cámara de combustión semicerrada; C.C.CH= Cámara de combustión con chimenea.

x= $p \leq 0,050$ comparada con el grupo referente.

a= 1 vs 2; b= 1 vs 3; c= 2 vs 3.

* = $p \leq 0,010$

** = $p > 0,010 \leq 0,050$

*** = $p > 0,050 \leq 0,070$ (Significancias marginales)

Tabla 6. Frecuencias de los biomarcadores en relación a la edad, tiempo de exposición, tipo de hornilla, ubicación y ventilación de la cocina en el epitelio bucal.

Variables	Biomarcadores de genotoxicidad						Biomarcador de citotoxicidad				Biomarcadores de Muerte celular							
	MN		BrN		TG		BN		Cc		Cr		Pn		Cl		TMC	
	C	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	
Grupo referente °		0,03 ± 0,12		0,24 ± 0,34		0,26 ± 0,34		3,26 ± 2,29		19,46 ± 5,47		39,03 ± 32,51		17,84 ± 12,43		37,03 ± 31,58		113,36 ± 57,42
Años de exposición °																		
≤ 36	1	0,34 ± 0,53 ^x		1,29 ± 1,45 ^x		1,63 ± 1,68 ^x		3,47 ± 2,38		21,32 ± 6,09		60,76 ± 34,74 ^x		22,15 ± 20,69		47,97 ± 40,12		152,21 ± 61,76 ^x
>36	2	0,39 ± 0,59 ^x		1,04 ± 0,72 ^x		1,43 ± 0,88 ^x		4,89 ± 3,14 ^x	a***	18,06 ± 4,24		42,22 ± 30,53	a**	23,33 ± 19,46		32,19 ± 25,39		115,81 ± 51,56 ^x
Horas de exposición °																		
≤ 4,5	1	0,41 ± 0,58 ^x		1,23 ± 1,56 ^x		1,64 ± 1,73 ^x		4,18 ± 3,42		20,50 ± 17,71		56,54 ± 37,15 ^x		22,04 ± 17,70		41,64 ± 40,52		140,71 ± 60,75 ^x
>4,5	2	0,33 ± 0,55 ^x		1,12 ± 0,75 ^x		1,45 ± 0,97 ^x		4,21 ± 2,47 ^x		19,07 ± 13,36		47,69 ± 31,20		23,24 ± 21,48		38,67 ± 29,45		128,67 ± 58,44
Ubicación de la hornilla en la vivienda °																		
Interior	1	0,36 ± 0,58 ^x		1,00 ± 0,65 ^x		1,36 ± 0,97 ^x		4,22 ± 3,15 ^x		19,42 ± 14,90		51,03 ± 31,83 ^x		23,78 ± 22,00		46,03 ± 36,47	a***	140,25 ± 55,94 ^x
Exterior	2	0,37 ± 0,54 ^x		1,34 ± 1,48 ^x		1,71 ± 1,61 ^x		4,18 ± 2,56 ^x		19,88 ± 15,61		51,44 ± 36,10		21,68 ± 17,74		33,32 ± 30,49		126,32 ± 62,57
Ventilación de la cocina °°																		
Escasa	1	0,49 ± 0,66 ^x	a**	0,89 ± 0,68 ^x		1,37 ± 1,09 ^x		4,54 ± 3,53 ^x		19,71 ± 15,78		46,57 ± 27,30		23,26 ± 20,56		42,23 ± 36,06		131,77 ± 57,37
Moderada	2	0,11 ± 0,21 ^x	c**	1,61 ± 1,74 ^x	a***	1,71 ± 1,86 ^x		4,00 ± 1,80 ^x		18,95 ± 13,51		63,00 ± 42,02 ^x		20,47 ± 20,03		40,79 ± 27,24		143,21 ± 54,88 ^x
Adecuada	3	0,41 ± 0,52 ^x		1,25 ± 0,91 ^x		1,66 ± 1,03 ^x		3,69 ± 2,24		20,31 ± 16,45		47,44 ± 34,39		24,38 ± 19,43		33,56 ± 37,97		125,69 ± 69,81
Tipo de hornilla °°																		
C.C.A.	1	0,31 ± 0,57 ^x		1,29 ± 1,29 ^x		1,60 ± 1,47 ^x		4,46 ± 2,27 ^x		19,00 ± 12,93		51,77 ± 34,97 ^x		24,40 ± 22,74		38,43 ± 34,08		133,60 ± 61,07
C.C.S	2	0,37 ± 0,58 ^x		1,40 ± 1,04 ^x	b**	1,77 ± 1,28 ^x		3,07 ± 1,87	a**	16,87 ± 16,76		56,87 ± 32,26 ^x		17,53 ± 14,21		43,53 ± 37,74		134,80 ± 59,57
C.C.CH	3	0,45 ± 0,54 ^x		0,78 ± 0,82 ^x	c***	1,23 ± 1,04 ^x		4,60 ± 4,10		22,85 ± 17,58		46,05 ± 33,49		23,80 ± 18,45		39,60 ± 32,71		132,30 ± 58,74
Actividad física (h / semanales) °																		
≤ 7	1	0,33 ± 0,50 ^x		1,02 ± 1,34 ^x	a*	1,35 ± 1,45 ^x	a*	4,40 ± 3,22 ^x		20,58 ± 14,87		46,44 ± 33,25		20,72 ± 17,18		38,42 ± 37,74		126,16 ± 63,92
>7	2	0,43 ± 0,65 ^x		1,39 ± 0,66 ^x		1,82 ± 1,04 ^x		3,89 ± 2,21		18,15 ± 15,74		58,85 ± 33,67 ^x		26,00 ± 23,65		42,15 ± 27,73		145,15 ± 49,81 ^x

° U de Mann-Whitney para significancias; t de Student para la obtención de medias y D.E.

°° H de Kruskal-Wallis para significancias; Anova de un factor para la obtención de medias y D.E.

C= Categorías; D.E= Desviación estándar.

MN= Micronúcleo; BrN= Brote nuclear; TG= Total de genotoxicidad; BN= Binucleada; Cc= Cromatina condensada; Cr= Cariorrética; Pn= Picnótica; Cl= Cariolítica; TMC= Total de muerte celular.

C.C.A= Cámara de combustión abierta; C.C.S= Cámara de combustión semicerrada; C.C.CH= Cámara de combustión con chimenea.

x= $p \leq 0,050$ comparada con el grupo referente.

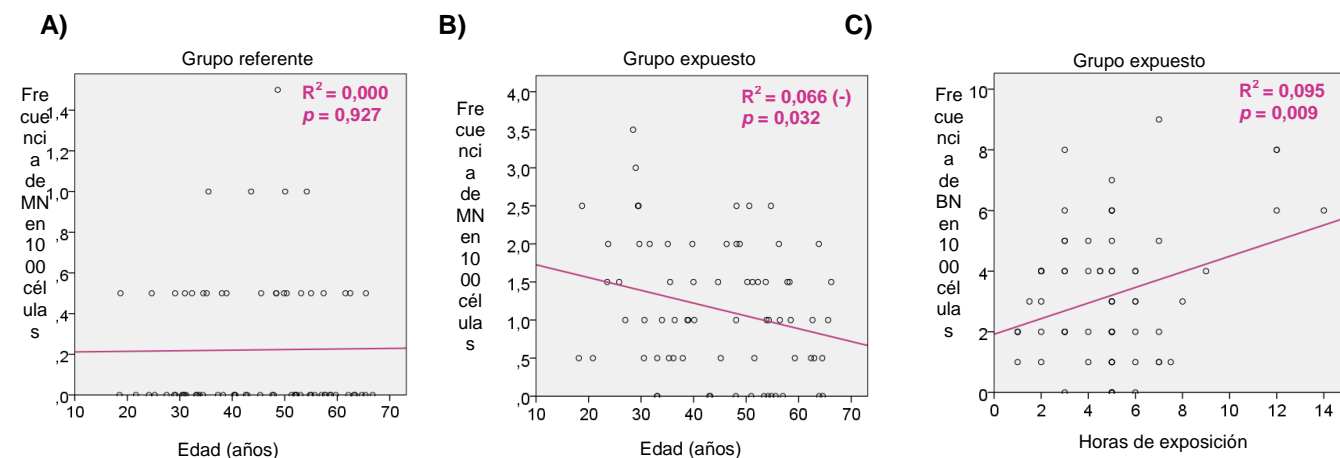
a= 1 vs 2; b= 1 vs 3; c= 2 vs 3.

* = $p \leq 0,010$

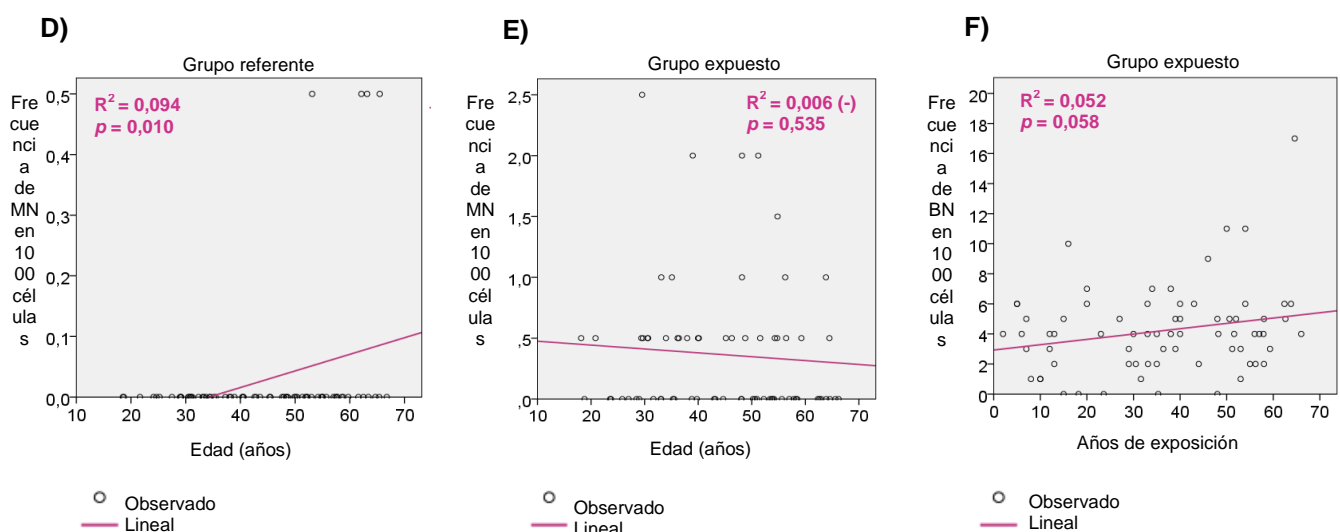
** = $p > 0,010 \leq 0,050$

*** = $p > 0,050 \leq 0,070$ (Significancias marginales)

Epitelio nasal



Epitelio bucal



Gráfica 1. Correlación de la frecuencia de MN con la edad de las mujeres de los grupos de estudio y de BN con el tiempo de exposición al humo de leña en el epitelio nasal y bucal. **A)** y **B)** Efecto de la edad sobre la frecuencia de MN del epitelio nasal en el grupo referente y expuesto respectivamente. **D)** y **E)** Efecto de la edad sobre la frecuencia de MN del epitelio bucal en el grupo referente y expuesto respectivamente. **C)** Efecto de los años de exposición al humo de leña sobre la frecuencia de BN en el epitelio bucal. **F)** Efecto de las horas diarias de exposición al humo de leña sobre la frecuencia de BN en el epitelio nasal.

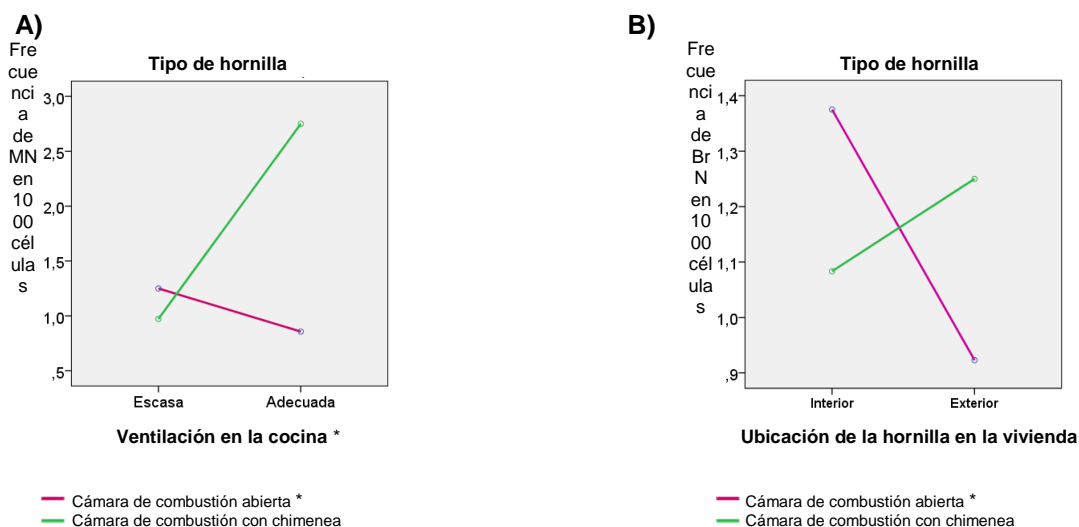
En la **Gráfica 1** se presenta la edad de los expuestos y referentes analizada mediante la prueba de coeficiente de correlación de Pearson y Spearman para conocer su efecto sobre la frecuencia de MN, al igual que la influencia de los años y las horas de exposición al humo de leña sobre el biomarcador BN. Se muestran aquellas donde se presentaron diferencias significativas.

En el epitelio nasal, la frecuencia de MN en el grupo referente se mantiene estable a medida que aumenta la edad (**Gráfica 1A**), mientras en el grupo expuesto hay una disminución significativa con una asociación del 7% ($p=0,032$) (**Gráfica 1B**). En el epitelio bucal, la frecuencia de MN en el grupo referente, aumenta de manera significativa con una asociación del 9% cerca de los 35 años ($p=0,010$) (**Gráfica 1D**), caso contrario al grupo expuesto donde se observó una tendencia lineal negativa de MN pero no mostró asociación ($p=0,535$) (**Gráfica 1E**).

En el análisis de correlaciones se observó que al incrementar los años de exposición al humo de leña, aumentan significativamente en un 5% la frecuencia de BN ($p=0,058$) (**Gráfica 1F**); y a medida que aumentan las horas diarias de exposición se presenta un aumento significativo de BN ($p=0,009$) con una asociación del 10% (**Gráfica 1C**).

7.5 FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES EN RELACIÓN A LA INTERACCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA INFRAESTRUCTURA DE LA COCINA

El efecto de la interacción entre las variables de la infraestructura de la cocina sobre los biomarcadores de genotoxicidad se expone en la **Gráfica 2**. Hornillas con chimenea generaron un aumento significativo de MN cuando las cocinas tenían una adecuada ventilación en comparación a aquellas escasamente ventiladas ($p=0,054$). Las hornillas con chimenea y adecuada ventilación presentaron un aumento significativo de MN en comparación a hornillas abiertas tanto con adecuada ventilación como con escasa ($p=0,050$ y $p=0,052$) (**Gráfica 2A**). Finalmente, las hornillas abiertas y al interior de las viviendas propician un aumento significativo de BrN en comparación a las ubicadas al exterior ($p=0,030$) (**Gráfica 2B**).



Gráfica 2. Interacción entre las características de la infraestructura de la cocina y su influencia en algunos biomarcadores en el epitelio nasal. **A)** Efecto de la interacción entre la ventilación en la cocina y el tipo de hornilla sobre la frecuencia de MN. **B)** Efecto de la interacción entre la ubicación de la hornilla en la vivienda y el tipo de hornilla sobre la frecuencia de BrN.

* Para las gráficas **2A** y **2B** el tipo de hornilla y la ventilación se reordenaron en dos categorías, donde la de cámara de combustión semicerrada se unió a la abierta y la ventilación moderada a la escasa.

7.6 EFECTO DE LA DIETA SOBRE LAS FRECUENCIAS DE LOS BIOMARCADORES DE LOS EPITELIOS NASAL Y BUCAL

En la **tabla 7** se muestra el efecto del consumo de pescado, frutas y verduras sobre la frecuencia de los biomarcadores en los epitelios evaluados.

En el epitelio nasal, las mujeres expuestas que nunca consumen pescado presentaron un aumento significativo de MN, en relación con las que consumen semanalmente ($p=0,052$). Igualmente, al comparar entre los grupos de estudio, las mujeres expuestas que consumen semanalmente pescado tuvieron un aumento altamente significativo para todos los biomarcadores, excepto TN-PN en comparación con las mujeres del grupo referente que nunca este alimento ($p\leq 0,01$).

El consumo de frutas y verduras no influyó en la frecuencia de los biomarcadores en el grupo expuesto. Al comparar los grupos de estudio, las expuestas con un alto consumo de frutas y verduras mostraron un aumento altamente significativo de MN, BrN y TG que las referentes con un bajo consumo ($p\leq 0,01$).

En el epitelio bucal, aquellas mujeres expuestas que consumen semanalmente pescado presentaron un aumento significativo de los biomarcadores MN, BrN y BN con respecto a las mujeres del grupo referente con condiciones contrarias ($p\leq 0,01$). Por otro lado, las mujeres expuestas con un consumo alto de frutas presentaron una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de CI frente a quienes tienen un bajo consumo ($p=0,054$). Igualmente, las mujeres expuestas con un alto consumo de frutas y verduras en comparación con las mujeres del grupo referente con condiciones contrarias presentaron un aumento significativo para los biomarcadores MN y BrN ($p\leq 0,05$).

Tabla 7. Efecto de la dieta sobre las frecuencias de los biomarcadores de los epitelios nasal y bucal.

Variables		Biomarcadores de genotoxicidad								Biomarcadores de citotoxicidad					
				MN		BrN		TG		BN		TN-PN		TC	
		C	N	Media ±	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p
Pescado															
Expuestos	Nunca	1	55	1,25 ± 0,87	a***	3,25 ± 2,05	b*	4,50 ± 2,35	b*	3,13 ± 2,36	b**	0,15 ± 0,36		3,27 ± 2,49	
	Semanalmente	2	15	0,77 ± 0,78	b*	2,70 ± 1,39	c*	3,47 ± 1,92	c*	3,33 ± 1,35	c*	0,47 ± 1,06		3,80 ± 1,90	c**
Referentes	Nunca	3	25	0,20 ± 0,35	d*	0,46 ± 0,63	d*	0,66 ± 0,66	d*	1,92 ± 1,38	d*	0,40 ± 0,76		2,32 ± 1,80	d**
	Semanalmente	4	45	0,23 ± 0,33	e*	0,66 ± 0,56	e*	0,89 ± 0,60	e*	1,89 ± 1,37	e*	0,29 ± 0,69		2,18 ± 1,74	e*
Frutas (porciones semanales)															
Expuestos	Bajo (≤ 3)	1	55	1,10 ± 0,77	b*	2,95 ± 2,03	a*	4,05 ± 2,32	b*	3,18 ± 2,35		0,15 ± 0,36		3,33 ± 2,49	
	Alto (>3)	2	15	1,30 ± 1,16	c*	3,80 ± 1,36	b*	5,10 ± 2,05	c*	3,13 ± 1,41	c*	0,47 ± 1,06		3,60 ± 1,92	c*
Referentes	Bajo (≤ 3)	3	20	0,20 ± 0,38	d*	0,50 ± 0,67	d*	0,70 ± 0,68	d*	2,25 ± 1,45	e*	0,35 ± 0,59		2,60 ± 1,67	e*
	Alto (>3)	4	50	0,23 ± 0,32	e*	0,62 ± 0,56	e*	0,85 ± 0,61	e*	1,76 ± 1,32		0,32 ± 0,77		2,08 ± 1,77	
Verduras (porciones semanales)															
Expuestos	Bajo (≤ 5)	1	50	1,20 ± 0,89	b*	3,16 ± 1,99	b*	4,36 ± 2,23	b*	3,18 ± 2,10	b**	0,14 ± 0,35		3,32 ± 2,21	b**
	Alto (>5)	2	20	1,00 ± 0,81	c*	3,08 ± 1,83	c*	4,08 ± 2,23	c*	3,15 ± 2,41	c*	0,40 ± 0,94		3,55 ± 2,80	c*
Referentes	Bajo (≤ 5)	3	28	0,13 ± 0,22	d*	0,57 ± 0,59	d*	0,70 ± 0,61	d*	2,04 ± 1,69	e**	0,36 ± 0,83		2,39 ± 2,18	
	Alto (>5)	4	42	0,29 ± 0,38	e*	0,67 ± 0,59	e*	0,88 ± 0,63	e*	1,81 ± 1,11		0,31 ± 0,64		2,12 ± 1,14	

Variables		Biomarcadores de genotoxicidad				Biomarcador de citotoxicidad		Biomarcadores de Muerte celular							
				MN	BrN	BN	Cc	Cr	Pn	CI	TMC				
		C	N	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p	Media ± D.E	p		
Pescado															
Expuestos	Nunca	1	55	0,34 ± 0,50	b*	1,05 ± 0,81	b*	4,02 ± 2,96	b**	18,93 ± 14,75	49,09 ± 33,12	23,24 ± 20,30	43,16 ± 35,77	134,42 ± 61,10	
	Semanalmente	2	15	0,47 ± 0,61	c*	1,57 ± 1,90	c*	4,87 ± 2,47	d**	22,27 ± 16,79	59,07 ± 35,91	c*	21,00 ± 19,08	27,73 ± 24,11	130,07 ± 53,63
Referentes	Nunca	3	25	0,04 ± 0,14	d*	0,28 ± 0,38	d*	2,76 ± 1,27	e**	20,72 ± 16,58	48,96 ± 36,11	e*	17,88 ± 11,17	45,20 ± 41,94	132,76 ± 63,52
	Semanalmente	4	45	0,02 ± 0,10	e*	0,21 ± 0,31	e*	3,53 ± 2,68		18,76 ± 14,97	33,51 ± 29,32		17,82 ± 13,19	32,49 ± 23,36	102,58 ± 51,35
Frutas (porciones semanales)															
Expuestos	Bajo (≤ 3)	1	55	0,31 ± 0,51	b*	1,19 ± 1,20	b*	4,02 ± 2,41	b*	20,55 ± 15,74	52,78 ± 32,87	23,02 ± 21,21	42,60 ± 34,91	138,95 ± 56,32	
	Alto (>3)	2	15	0,57 ± 0,68	c*	1,07 ± 0,88	c*	4,87 ± 4,19	d**	16,33 ± 12,63	45,53 ± 37,31	c*	21,80 ± 14,88	29,80 ± 29,66	a***
Referentes	Bajo (≤ 3)	3	20	0,03 ± 0,11	d*	0,30 ± 0,41	d*	2,50 ± 1,40		19,70 ± 14,93	48,10 ± 34,03		16,65 ± 11,12	42,30 ± 32,31	126,75 ± 54,00
	Alto (>3)	4	50	0,03 ± 0,12	e*	0,21 ± 0,30	e*	3,56 ± 2,52		19,36 ± 15,83	35,40 ± 31,51		18,32 ± 12,99	34,92 ± 31,36	108,00 ± 58,39
Verduras (porciones semanales)															
Expuestos	Bajo (≤ 5)	1	50	0,36 ± 0,54	b*	1,13 ± 0,78	b*	4,18 ± 2,61		18,00 ± 14,62	50,40 ± 31,15	21,34 ± 19,73	42,16 ± 37,20	131,90 ± 61,21	
	Alto (>5)	2	20	0,38 ± 0,60	c*	1,25 ± 1,76	c*	4,25 ± 3,51	c**	23,75 ± 16,02	53,30 ± 40,27	26,30 ± 20,50	d***	34,10 ± 24,37	137,45 ± 55,29
Referentes	Bajo (≤ 5)	3	28	0,02 ± 0,09	d*	0,36 ± 0,43	d*	3,68 ± 2,91	e***	21,14 ± 16,97	44,29 ± 28,81	c*	15,21 ± 9,26	42,86 ± 39,90	123,50 ± 63,78
	Alto (>5)	4	42	0,04 ± 0,13	e*	0,15 ± 0,23	f**	2,98 ± 1,76		18,33 ± 14,49	35,52 ± 34,66		19,60 ± 13,98	33,14 ± 24,32	106,60 ± 52,46

U de Mann Whitney para significancia entre dos categorías; Anova de un factor para la obtención de medias y D.E.

MN= Micronúcleo; **BrN=** Brote nuclear; **TG=** Total de genotoxicidad; **BN=** Binucleada; **TN - PN=** Tri-polinucleada; **TC=** Total de citotoxicidad; **Cc=** Cromatina condensada; **Cr=** Cariorréctica; **Pn=** Picnótica; **CI=** Cariolítica; **TMC=** Total de muerte celular; **IMC =** Índice de masa corporal; **R²=** Rho al cuadrado; **C=** Categorías; **N =** Número de sujetos; **D.E=** Desviación estándar.

a= 1 vs 2; b= 1 vs 3; c= 1 vs 4; d= 2 vs 3; e= 2 vs 4; f= 3 vs 4.

* = p ≤ 0,010

** = p > 0,010 ≤ 0,050

*** = p > 0,050 ≤ 0,070 (Significancias marginales)

7.7 CORRELACIONES ENTRE LOS BIOMARCADORES EN EL GRUPO EXPUESTO

En la **tabla 8** se ilustran los resultados de la correlación entre los diferentes biomarcadores de los epitelios nasal y bucal del grupo expuesto. En el epitelio nasal, el estudio mostró una asociación lineal positiva significativa del 6% ($p=0,052$) entre los biomarcadores de genotoxicidad (MN versus BrN) y una asociación cuadrática significativa del 9% ($p=0,043$) entre biomarcadores de citotoxicidad (BN versus TN-PN). Por otro lado entre los biomarcadores de genotoxicidad con los de citotoxicidad se presentaron asociaciones lineales negativas significativas ($p<0,01$) del 17% entre BrN versus BN.

En el epitelio bucal se presentó una asociación lineal positiva significativa del 7% entre el biomarcador genotoxicidad BrN y de muerte celular Cr ($p=0,027$). Por el contrario, se observaron asociaciones lineales negativas significativas al relacionar los biomarcadores de genotoxicidad con el IR, con asociaciones del 7% en MN versus IR ($p=0,030$) y del 9% en BrN versus IR ($p=0,010$). Igualmente, se obtuvieron asociaciones lineales negativas significativas entre el biomarcador de citotoxicidad BN con el biomarcador de muerte celular CI en un 9% ($p=0,011$) y con IR en un 8% ($p=0,021$). Una asociación lineal positiva significativa del 26% se encontró entre los biomarcadores de muerte celular Cc y Pn. Finalmente, se hallaron asociaciones lineales positivas significativas entre el IR con los biomarcadores de muerte celular Cr en un 27% y CI en un 28%.

Tabla 8. Correlaciones entre los biomarcadores del grupo expuesto

Biomarcadores	Biomarcadores de genotoxicidad						Biomarcadores de citotoxicidad														
	MN		BrN		TG		BN		TN - PN		TC										
	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p									
Epitelio nasal	Biomarcadores de genotoxicidad																				
	MN																				
	BrN	0,055 x***																			
	TG	0,329 x*		0,865 x*																	
	Biomarcadores de citotoxicidad																				
	BN	0,000		-0,172 x*		-0,118 x*															
	TN - PN	-0,011		0,000		-0,003		0,090 y**													
TC	-0,0001		-0,148 x*		-0,108 x*		0,941 x*		0,202 x*												
Biomarcadores	Biomarcadores de genotoxicidad				B. cito				Biomarcadores de Muerte celular												
	MN		BrN		TG		BN		Cc		Cr		Pn		CI		TMC		IR		
	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p			
Epitelio bucal	Biomarcadores de genotoxicidad																				
	MN																				
	BrN	0,013																			
	TG	0,272 x*		0,824 x*																	
	Biomarcador de citotoxicidad																				
	BN	0,003		-0,00001		0,000															
	Biomarcadores de Muerte celular																				
	Cc	-0,005		-0,001		-0,002		0,019													
	Cr	0,003		0,070 x**		0,062 x**		-0,032		-0,016											
	Pn	-0,024		-0,008		-0,021		0,029		0,263 x*		-0,063 x**									
CI	0,000		0,026		0,021		-0,091 x**		-0,010		0,120 x*		0,001								
TMC	-0,001		0,043		0,027		-0,033		0,091 x**		0,425 x*		0,118 x*		0,575 x*						
Índices																					
IR	-0,068 x**		-0,092 x*		-0,138 x*		-0,076 x**		-0,025		0,269 x*		-0,011		0,281 x*		0,275 x*				

Coefficientes de correlación de Pearson y Spearman. R²= Rho al cuadrado.

MN= Micronúcleo; BrN= Brote nuclear; TG= Total de genotoxicidad; BN= Binucleada; TN - PN= Tri-polinucleada; TC= Total de citotoxicidad; Cc= Cromatina condensada; Cr= Cariorréctica; Pn= Picnótica; CI= Cariolítica; TMC= Total de muerte celular; IR= Índice de reparación.

x = Asociación lineal; y = Asociación cuadrática.

* = $p \leq 0,010$

** = $p > 0,010 \leq 0,050$

*** = $p > 0,050 \leq 0,070$ (Significancias marginal).

8. DISCUSIÓN

El Plan Decenal de Salud Pública de Colombia, ha identificado que el desarrollo de las enfermedades depende en un 48% al estilo de vida, 27% a la biología, 19 % al entorno y 11% a los Servicios de Salud.⁴⁴ Dentro del entorno, se encuentra la exposición a contaminantes ambientales como la polución al interior de las viviendas, la cual en zonas rurales se ha atribuido principalmente al humo de leña. Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han identificado que el humo de leña contribuye sustancialmente al desarrollo de diversos tipos de cánceres de vías aéreas y de enfermedades respiratorias crónicas y agudas de mayor importancia en salud pública a nivel mundial.^{13,22} A nivel nacional, hay estudios que asocian el cáncer de pulmón y de cuello uterino con este factor de riesgo,^{91,92} pero pocos han profundizado en el efecto genotóxico sobre epitelios de vías aéreas respiratorias, especialmente los que recubren la cavidad nasal y bucal, los cuales se encuentran en contacto directo con las exposiciones ambientales. Por lo tanto, es transcendental comprender cómo los factores de riesgo ambientales influyen en la progresión de enfermedades mediante el uso de biomarcadores de efecto temprano, con el fin de desarrollar estrategias de prevención y promoción.¹⁴ En nuestro estudio, evaluamos el efecto de la exposición al humo de leña sobre células de los epitelios nasal y bucal mediante la frecuencia de biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad, asociándolos con variables que según Holland *et al* (2008) pueden modular el daño generado por la exposición, tales como la edad, nutrición y características de la exposición.⁵³

Este estudio se realizó con un total de 140 mujeres, 70 expuestas al humo de leña pertenecientes a veredas aledañas a los municipios de Popayán y Timbío del departamento del Cauca, y 70 no expuestas de barrios periféricos de la ciudad de Popayán como grupo control. La muestra poblacional estuvo acorde a lo sugerido por Ceppi *et al.* (2010) en un metanálisis realizado con 30 estudios, que evalúan el efecto de exposiciones ambientales y ocupacionales sobre el epitelio bucal mediante el biomarcador de MN; se recomienda emplear un tamaño poblacional mínimo de 120 individuos (60 expuestos y 60 referentes) para observar un incremento de MN del 50%.⁵¹ La edad promedio de las mujeres fue de 44,7 años y de acuerdo a las características fenotípicas se determinó que el 100% de la población de estudio fue mestiza, lo que es consistente con Barnholtz-Sloan *et al.* (2008) quienes afirman que la población caucana es el resultado de la mezcla de tres poblaciones parentales (Europea, amerindia y Africana) y **(Tabla 1)**.

La OMS plantea que la salud de los individuos depende de una serie de Determinantes Sociales de la Salud como son Estructurales, Intermedios y Biológicos que incluyen riqueza, posición socioeconómica, nivel educativo, género, edad, etnia y ambiente.³⁶ Mediante un cuestionario aplicado a la población de estudio, se identificó que los efectos sobre la salud causados por la exposición al humo de leña, se ven influenciados por Determinantes Estructurales como el género, ya que al igual que en varios estudios a nivel internacional nosotras observamos que las mujeres son quienes están más expuestas debido al rol que desempeñan en el hogar, pasando la mayor parte del tiempo en sus casas,^{1,180} razón por la cual, nuestra muestra poblacional estuvo conformada sólo por mujeres, adicionalmente, muchas mujeres de nuestra población de estudio emplean la leña para preparar alimentos que venden en las plazas de mercado **(Anexo 16)**, encontrándose que el 60% de ellas cocinan con leña por más de 4,5 horas al día y el 51,4% lo han hecho por más de 36 años **(Tabla 2)**. La mayoría de las mujeres de nuestro estudio reportaron no terminar la primaria y pocas la secundaria, así como no tener

ingresos adecuados y estables, lo que les impide acceder a energías más saludables como el gas o la electricidad. El estrato socio-económico de todas las mujeres expuestas fue 1, clasificado en Colombia como Bajo-Bajo o de pobreza absoluta,¹⁸¹ y como dicen los autores Bruce *et al.* (2001), la pobreza es una de las principales causas de la exposición crónica al humo de leña.⁹

Los Determinantes Intermedios analizados en nuestro estudio reflejan las condiciones de vida de los individuos. El 51,4% de las mujeres tienen la hornilla al interior de la vivienda, el 50% una escasa ventilación en la cocina y el 50% una hornilla de combustión abierta, características de la infraestructura que según algunos autores aumentan las concentraciones de los compuestos del humo de leña en la vivienda (**Tabla 2**).^{9,182} Aunque el cuestionario incluyó Determinantes Biológicos como enfermedades hereditarias, las mujeres en su mayoría reportaron no presentarlas. En el estilo de vida de las mujeres, se encontró que más del 70% de las expuestas presentan una dieta baja en pescado, frutas y verduras y más de la mitad caminan al menos de 7 horas semanales (61,4%); condiciones que pueden aumentar la vulnerabilidad a los efectos tóxicos de la exposición al humo de leña (**Tabla 1**).¹⁸³

Análisis de las frecuencias de los biomarcadores en los epitelios nasa y bucal en los grupos de estudio.

El efecto de las exposiciones sobre el ADN ha sido evaluado en células como los eritrocitos, linfocitos y células epiteliales exfoliadas como orales, uroteliales y nasales mediante biomarcadores de efecto temprano como MN. El uso de este biomarcador es cada vez mayor en estudios de poblaciones humanas por la amplia evidencia que relaciona su frecuencia a exposiciones ambientales y ocupacionales, estilo de vida, perfil genético, cáncer y enfermedades degenerativas y de envejecimiento prematuro.¹⁸⁴ Recientemente, estudios que evalúan el daño del ADN en células exfoliadas se han venido implementado debido a su promesa como un método mínimamente invasivo.⁵¹ Las células exfoliadas del epitelio bucal han recibido especial atención, debido a su especificidad para la detección de los efectos de la exposición a agentes genotóxicos inhalados o ingeridos, y la facilidad de almacenamiento de las muestras.¹⁵¹ El epitelio bucal permite la evaluación de otras anomalías nucleares tales como brotes nucleares (indicativo de amplificación de genes), células binucleadas (causada por detención o fallas en la citocinesis), y diversas formas de muerte celular como cromatina condensada, células cariorréticas, células picnóticas y células cariolíticas así como la frecuencia de células basales y diferenciadas.¹⁵¹ La implementación del Ensayo Citómico en células bucales se ha incrementado en la última década,^{50,53,151} sin embargo, los laboratorios a nivel mundial, han realizado diversos protocolos para la realización de este ensayo, de tal manera que los resultados varían ampliamente;⁵³ por dicha razón, el proyecto HUMN_{XL} (Proyecto Internacional de Micronúcleos en Poblaciones Humanas en Células exfoliadas) hace una recopilación de los diferentes protocolos para optimizar los métodos de muestreo, procesamiento, fijación y tinción.⁵³ Nuestro protocolo sigue estas recomendaciones pero optimizamos la calidad de las preparaciones citológicas en aspectos como dispersión celular, limpieza de la superficie del portaobjetos y contratante en la tinción; lo que en conjunto conlleva a un registro de las anomalías nucleares más fácil y confiable.

Contrariamente, aunque el epitelio nasal es apto para la evaluación de sustancias tóxicas, ha recibido poca atención, encontrándose en revisiones bibliográficas hasta la fecha sólo 22 estudios que han empleado la prueba de MN en células nasales, evaluando principalmente exposiciones de tipo ocupacional.^{32,46,97-102,104-106,109-116,185} Sin embargo, los autores Bruschiweiler *et al.* (2014) y Demircigil *et al.* (2010) afirman que no existe ningún protocolo experimental

normalizado para MN en células nasales y por lo tanto futuros estudios deben tratar de estandarizarlo.^{32,116} Es por esto que fue necesario partir del protocolo propuesto por Thomas *et al.* (2009)¹⁵⁰ para células exfoliadas del epitelio bucal, pero al obtener resultados muy pobres, se realizaron modificaciones en el muestreo y procesamiento. De igual modo, aun cuando el protocolo de tinción recomendado es el de Tolbert *et al.* (1991),¹⁸⁶ nosotras realizamos modificaciones en algunos reactivos, concentraciones, tiempos y orden de los pasos de tinción. Estas modificaciones contribuyeron a mejorar sustancialmente las preparaciones citológicas en aspectos como conservación de la apariencia y la estructura celular, eliminación de cuerpos extraños, limpieza de la placa, densidad, dispersión y contraste en la tinción (**Anexo 9D-9F**), permitiendo que la mayoría de las células colectadas puedan ser analizadas. Además, nuestro protocolo permite específicamente la obtención de células del epitelio respiratorio nasal (columnares, caliciformes y basales) eliminando células del sistema inmune y evitando la presencia de células del epitelio escamoso vestibular¹⁶⁶ (**Anexo 8**). En comunicaciones directas con los científicos Michael Fenech, Sang Hag Lee, Armen Nersesyan y Norbert Kleinsasser quienes han trabajado con este epitelio, fue posible confirmar que hasta el presente no han podido obtener preparaciones citológicas con las características anteriormente nombradas, y afirmaron que nuestros esfuerzos han realizado un gran aporte.

La frecuencia basal de MN en células columnares del epitelio respiratorio nasal en los estudios realizados hasta la fecha va desde 0.23 ± 0.31 hasta 2.84 ± 1.61 ,^{32,97-101,104-106,109-116,185} siendo 13 veces más alta que la de nuestro grupo referente (0.22 ± 0.34) e inclusive 2,5 veces más alta que la de nuestro grupo expuesto (1.14 ± 0.86). Este rango tan amplio podría deberse a que el tamaño de muestra de estos estudios varía entre 13 y 88 individuos, lo cual influye en la potencia o sensibilidad de la prueba como lo afirma Ceppi *et al.* (2010).⁵¹ En cuanto al epitelio bucal, el consorcio HUMN_{XL} ha construido una base de datos con la frecuencia basal de MN de 30 laboratorios, estableciendo un intervalo de 0,3 a 1,7 en individuos no expuestos.¹⁵¹ En nuestro estudio, la frecuencia basal de MN en el epitelio bucal fue 0.03 ± 0.12 (**Tabla 3**), ubicándose por debajo del rango hallado en el metanálisis del HUMN_{XL}. Estas frecuencias basales tan altas, podrían deberse a que algunos de los estudios que emplearon el epitelio nasal y algunos del metanálisis del epitelio bucal, emplean las tinciones inespecíficas de Giemsa, hematoxilina y Papanicolaou (**Anexo 10A, 10E, 11A-11C**), las cuales no son recomendadas puesto que tiñen cuerpos extraños así como organelos y queratinocitos gracias a su estructura rica en proteínas, los cuales pueden ser confundidos fácilmente con MN, aumentando las estimaciones de las frecuencias basales.^{35,162,187} Esto se refleja en los estudios de Ye *et al.* (2005) y Mergener *et al.* (2014) con frecuencias basales elevadas de MN de 1.25 ± 0.75 y 2.70 ± 1.53 respectivamente para el epitelio nasal y El-Setouhy *et al.* (2008) y de Gadhia *et al.* (2010) con frecuencias altas de MN de 4.1 ± 1.9 y 6.00 ± 0.25 respectivamente para el epitelio bucal.^{98,105,188,189}

Aunque el proyecto HUMN_{XL} propone la evaluación del efecto de exposiciones ambientales y ocupacionales en el epitelio nasal, no especifica cuál de los dos epitelios que conforman la cavidad nasal es el adecuado para la lectura de MN y en qué tipo de células se debe hacer el registro.⁵⁰ Del mismo modo, la mayoría de los estudios no especifican en qué epitelio o células están realizando el registro, o bien, evalúan el biomarcador tanto en células columnares del epitelio respiratorio nasal como en células escamosas del epitelio vestibular nasal confundiendo entre sí (**Anexo 10A, 10B**),¹⁰⁹ haciendo una lectura indiscriminada de las células y reportando una frecuencia total de los biomarcadores,^{109,114,115} lo que posiblemente explicaría la alta variabilidad de las frecuencias basales entre las investigaciones. Esto no es adecuado ya que los epitelios varían en estructura, función y cinética: el epitelio columnar está conformado por una sola capa que presenta tanto células basales como diferenciadas (**Fig. 6C**), recubierta por una mucosidad compuesta de carbohidratos y proteínas cuya función es atrapar y eliminar

partículas muy pequeñas. Aunque la cinética de este epitelio no se conoce, durante la estandarización se observó que las células basales tardan entre 13 y 15 días en diferenciarse y para renovar el epitelio columnar. El epitelio escamoso que recubre los vestíbulos nasales, es una epidermis dividida en cuatro estratos conformados por varias capas celulares (**Fig. 6D**), y es más impermeable y menos sensible a exposiciones puesto que su último estrato es queratinizado, lo cual puede influir en la frecuencia de MN.¹²³ Si bien los MN se forman en los dos epitelios, Speit *et al* (2011) afirma que es posible que se pierda el efecto al reportar una frecuencia total ya que conduce a una dilución del efecto potencial de la exposición sobre cada región,¹⁹⁰ además, Sarto *et al.* (1990) afirma que en cada muestra se obtienen diferentes porcentajes de células columnares en comparación con las escamosas (de 5 a 50%), dependiendo de la profundidad del muestreo en la cavidad nasal que varía en función de la tolerancia del sujeto.¹⁰⁹ Es más apropiado que la toma de la muestra se realice en el epitelio respiratorio nasal y el registro en las células columnares, ya que algunos estudios reportan que dichas células reflejan el daño presente en células de vías aéreas inferiores, puesto que están recubiertas por el mismo tipo de epitelio,¹⁹¹ además, son las que se encuentran en mayor proporción en el epitelio nasal respiratorio.¹⁶⁶ El epitelio vestibular es un buen indicador del efecto sobre el ADN causado por exposiciones ya que es de fácil acceso y sus células son resistentes al procesamiento y tinción (**Anexo 8A**). Sin embargo consideramos que al ser epidermis, el daño evaluado sería equivalente al presente en cualquier zona de la piel. En tal caso como sugiere Sarto *et al.* (1990), si se desea evaluar el efecto de las exposiciones en toda la cavidad nasal, el muestreo debe realizarse discriminadamente según los epitelios (respiratorio y vestibular) al igual que informar la frecuencia de MN por separado.¹⁰⁹ De esta manera, en nuestro estudio se realizó el muestro en el epitelio respiratorio nasal y el registro de biomarcadores en células columnares.

Igualmente la presencia de mucosidad en extendidos directos, hace que las muestras presenten hasta un 96% de macrófagos y granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos),¹¹¹ generando falsos positivos debido a que sus núcleos se asemejan en tamaño y apariencia a los MN (**Anexo 8C, 8D**); además, esta mucosidad mas la presencia de tejido generan aglutinamiento, dando como resultado una mala distribución y un número insuficiente de células impidiendo un adecuado registro de los biomarcadores (**Anexo 10D-10F**). Esta es posiblemente la razón por la cual algunos autores afirman que por cada preparación citológica sólo pudieron obtener 500 células adecuadas para la lectura, o bien debieron realizar de 5 a 15 preparaciones citológicas por individuo para obtener el número adecuado de células.^{106,111,116} En nuestro estudio, se obtuvo una adecuada densidad celular, en donde $\frac{1}{4}$ de la superficie del portaobjetos fue suficiente para obtener 2000 células (**Anexo 9D**). Sumado a esto, en algunos estudios el número de células registradas varió entre cada individuo, mientras en nuestro estudio se registró el mismo número de células para cada sujeto.^{98-100,109,111,114,115}

Por otro lado, nuestra frecuencia de MN en el epitelio nasal es consistente con los estudios realizados por Godderis *et al.* (2004) (0.23 ± 0.31) y por Ballarin *et al* en sus dos estudios (0.25 ± 0.22 y 0.28 ± 0.38),^{99,100,104} y la frecuencia de MN en el epitelio bucal con los estudios de Martins *et al.* (2009) (0.04 ± 0.06) y Karahalli *et al.* (1999) (0.03 ± 0.03).^{192,193} Una importante razón de la semejanza entre estas frecuencias con las halladas en nuestro estudio, es el empleo de la tinción Feulgen, la cual es específica para el ADN permitiendo evitar los falsos positivos.^{150,162} Sin embargo, estudios como los de Carlin *et al.* (2014), Mendonça *et al.* (2011) y Sarto *et al.* (1987), en los que se emplea la tinción de Feulgen reportan frecuencias altas de MN en el epitelio bucal, posiblemente por el inadecuado contraste en las preparaciones citológicas, puesto que el colorante Fast Green empleado para la tinción de citoplasma cubre el núcleo al ser muy intenso, o bien el colorante Schiff empleado para teñir el núcleo presenta una baja intensidad, impidiendo la adecuada identificación y clasificación de las anomalías nucleares

contribuyendo al registro inexacto de los biomarcadores y una desestimación del efecto de las exposiciones (**Anexo 11D-11G**).¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Consideramos que en nuestro estudio logramos optimizar las condiciones de coloración obteniendo el citoplasma de color verde manzana tenue y el núcleo de color fucsia intenso (**Anexo 9C**). El aglutinamiento y la presencia de tejidos en las preparaciones citológicas de estudios como el de Carlin *et al.* (2014),¹⁹⁴ también puede causar la variabilidad entre las frecuencias de los biomarcadores, lo cual según Suruda *et al.* (1993) se debe al empleo de espátulas mediante la cual se toman trozos grandes del epitelio¹¹⁰ (**Anexo 11D-11G**).

Este es el primer estudio que reporta biomarcadores exclusivamente en células columnares del epitelio respiratorio nasal en una población expuesta a contaminantes, por tanto, las frecuencias basales de BrN y BN en nuestro estudio no son comparables con los únicos cuatro (4) estudios que evaluaron anomalías nucleares en el epitelio nasal, puesto que como se mencionó anteriormente, su muestra celular estuvo conformada tanto por células columnares como por escamosas o bien no mencionan en qué tipo de células registraron los biomarcadores.^{97,98,114,115} En nuestro estudio, las frecuencias basales de BrN y BN en el epitelio bucal fueron de $0,24\pm 0,34$ y $3,26\pm 2,29$ respectivamente (**Tabla 3**), siendo semejantes a las reportadas por Nersesyan *et al.* (2006) con valores de $0,20\pm 0,08$ para BrN y $3,42\pm 0,88$ para BN.¹⁹⁷ En comparación con el metanálisis de Bonassi *et al.* (2011), la frecuencia de BrN fue menor y la de BN semejante ($1,36\pm 0,08$ y $3,04\pm 0,20$).¹⁵¹ En concordancia con estos estudios, nuestro grupo referente estuvo conformado por sujetos sanos y tuvieron en cuenta los mismos factores de confusión y criterios de exclusión tales como historial de cáncer, quimioterapia, consumo de medicamentos citostáticos, fumadores, consumidores de alcohol, expuestos a radiación ionizante y habitantes de zonas alejadas del lugar de exposición. En cuanto a los biomarcadores de muerte celular del epitelio bucal, cabe mencionar que las frecuencias reportadas por los artículos se encuentran en un rango muy amplio: Cc: $0,05\pm 0,01$ a $51,30\pm 23,22$;^{47,198} Pn: $0,62\pm 0,13$ a $27,06\pm 1,12$;^{178,199} Cr: $0,96\pm 0,33$ a $14,93\pm 6,27$;^{47,200} Ci: $0,88\pm 0,27$ a $55,30\pm 18,80$.^{47,201} Observándose que nuestras frecuencias se hallan dentro de este rango (**Tabla 3**).

La falta de uniformidad en las frecuencias basales de los biomarcadores evaluados en este estudio, podría deberse a que son diferentes poblaciones humanas con perfiles genéticos y condiciones ambientales muy diferentes. Así como evidencia la falta de homogeneidad en el protocolo, identificación y registro de los biomarcadores, lo que podría solucionarse con los nuevos criterios para la identificación de anomalías nucleares propuestos por Bolognesi *et al.* (2013).¹⁵²

El análisis estadístico de nuestro estudio, reveló una diferencia significativa ($p=0,000$) de las frecuencias de los biomarcadores MN y BrN del grupo expuesto en comparación al grupo referente tanto en el epitelio nasal como en el bucal (**Tabla 3**). Este aumento, refleja el daño genotóxico producido por el humo de leña inhalado, ya que presenta una gran cantidad de compuestos mutagénicos y carcinogénicos como el benzo[a]pireno, el benceno, el formaldehído entre otros^{35,202} que al ser bioactivados por el sistema de quinona-hidroquinona-semiquinona (CYP 450)¹²⁷ son reducidos a superóxidos, y luego a peróxidos de hidrógeno y a radicales hidroxilo, que al interactuar con la membrana celular causan peroxidación lipídica, liberando radicales como $*R^*$, RO, y ROO*.¹²⁴ Este daño causado en la membrana celular lleva a una mayor liberación de hierro catalíticamente activo lo que aumenta la generación de ROS y la formación de aldehídos (hexanal y 4-hidroxi-nonenal).¹²⁵ Los metabolitos de estos compuestos pueden no desactivarse debido al agotamiento de enzimas antioxidantes como la Sulfotransferasa (SOD) o a la disminución de la actividad de enzimas que desactivan selectivamente cada una de las ROS.^{35,203} Estas moléculas interactúan directamente con el

ADN oxidando bases nucleofílicas, causando duplicaciones de secuencias del ADN y quiebres de cadena simple (SSB) o de cadena doble (DBS).^{35,126,204} Los DSB producidos por el humo de leña, son reparados principalmente por los mecanismos de reparación de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación no homóloga (HR),³⁵ sin embargo si estos mecanismos fallan, los fragmentos de cromosomas acéntricos generados debido a las lesiones del ADN, se expresan como MN y las duplicaciones se expresan como BrN durante la anafase y la telofase, observándose en células en interfase.^{114,185,205}

En nuestra investigación, el grupo expuesto mostró un aumento significativo del biomarcador BN en los dos epitelios evaluados en comparación al grupo referente ($p < 0,01$) (**Tabla 3**), lo que se explicaría por nanopartículas presentes en el MP_{2,5}, del humo de leña, las cuales interactúan o rompen filamentos de actina o microtúbulos, inhibiendo la formación del anillo contráctil de actina-miosina causando defectos en la citocinesis,^{60,70} o bien, estas células pueden ser producidas por daños genotóxicos que detienen la división citoplasmática. Las de células BN también pueden formarse por disturbios en el contenido de ADN celular, indicando que la frecuencia de estas podría ser utilizada como un biomarcador de riesgo de aneuploidía que puede resultar en la formación de células tetraploides y células aneuploides posteriores a la división de la tetraploide.^{163,206-208} La alta frecuencia de BN observada en nuestro grupo expuesto que incluso es mayor a la de los biomarcadores de genotoxicidad (MN y BrN), apoya la hipótesis de Wulsch *et al.* (2013) que son útiles para estudios de evaluación de sustancias tóxicas, en particular para los estudios de inhalación en epitelios de vías aéreas respiratorias.¹¹⁴

La apoptosis es un proceso biológico fundamental, que es controlado genéticamente y se requiere para el desarrollo normal y la homeostasis del tejido,²⁰⁹ sin embargo, en presencia de xenobióticos, este proceso puede verse alterado. En nuestro estudio, el aumento significativo del biomarcador Cr se explicaría por la activación de las vías apoptóticas, las cuales según el estudio de Roychoudhury *et al.* (2012), se dan por el estrés oxidativo causado por los metabolitos del humo de leña que activan la proteína AKT, encargada de activar los procesos apoptóticos en el sistema respiratorio²⁰³ con el fin de eliminar las lesiones primarias y evitar que se conviertan en mutaciones.^{14,210,211} Esto sugiere que la apoptosis actúa como un mecanismo de vigilancia eliminando las células con daño genético, razón por la cual, la apoptosis en exceso puede servir como un indicador de daño genotóxico.²¹²

Este no es el primer estudio que no encuentra un aumento significativo de los biomarcadores Cc, Pn y Cl en exposiciones particulares, tal es el caso de exposición a radiación ionizante, no ionizante y de pesticidas.^{151,209,213,214} La diferencia no significativa de Cl entre los grupos de estudio, sugiere que la respuesta celular a la exposición al humo de leña no incluye un efecto citotóxico que conduce a la necrosis, ya que según Johsi *et al.* (2010) frecuencias altas de Cl evidencia la presencia de necrosis.²¹² Se ha comprobado que el humo de leña produce resequedad en los epitelios de vías aéreas superiores,²¹⁵ esto podría producir una aceleración en el proceso de descamación causando una pérdida de las células Pn y Cl presentes en el último estrato del epitelio, lo que también explicaría el no aumento de estos biomarcadores.

En las bases de datos científicas no se hallaron estudios que evaluaran la exposición al humo de leña con poblaciones colombianas empleando biomarcadores moleculares en tejidos diana o centinelas, y más específicamente utilizando MN u otras anomalías nucleares en células exfoliadas de los epitelios nasal y bucal. A nivel internacional se han realizado estudios utilizando biomarcadores como cometa, ICH, AC y MN en linfocitos de sangre periférica^{33-35,93,216} y un estudio utilizando el Ensayo Halo y Cometa en el epitelio bucal.¹⁰⁷ Estas investigaciones encontraron un aumento significativo de los biomarcadores en el grupo expuesto, concluyendo que el humo de leña tiene un efecto tóxico sobre linfocitos y células bucales. Hasta la fecha sólo

Mondal *et al.* (2010) evaluaron esta exposición en una población de mujeres de la India empleando el Ensayo Citómico en el epitelio bucal.³⁵ Nuestros hallazgos se asemejan a lo reportado por ellos, quienes también encontraron diferencia significativa para MN, BrN y BN ($p < 0,00$). Sin embargo, las frecuencias de estos biomarcadores en las mujeres expuestas fueron 10, 9 y 1,4 veces mayores a las de nuestro grupo expuesto (**Tabla 3**). A diferencia de nuestros resultados, ellos encontraron un aumento significativo en los biomarcadores de muerte celular. Estos valores tan altos encontrados por Mondal *et al.* (2010), podrían deberse a las condiciones extremas en las que viven las mujeres expuestas de la India, puesto que debido a razones culturales y variaciones estacionales en zonas rurales, la mayor parte de la cocción de los alimentos se realiza en un espacio cerrado con mala ventilación.²¹⁷ Sumado a esto, algunos estudios han reportado que las mujeres de la India presentan un alto grado de desnutrición,^{218,219} lo cual influye en el aumento de la frecuencia de los biomarcadores, ya que una dieta no balanceada carece de agentes antioxidantes que ayuden a desactivar o reducir las especies reactivas de oxígeno y disminuir el efecto tóxico del humo de leña.²²⁰ Otro factor que puede estar aumentando la frecuencia de los biomarcadores, son las altas concentraciones de polución en la India, clasificado entre los 11 países con mayor contaminación ambiental a nivel mundial.²²¹ Además, la utilización de la tinción de Papanicolaou puede generar falsos positivos puesto que tiñe cuerpos de queratina, los cuales se encuentran con mayor frecuencia en personas expuestas al humo de leña.³⁵

A nuestro conocimiento no se han realizado estudios de los efectos genotóxicos de la exposición al humo de leña en el epitelio nasal y hasta el momento sólo cuatro (4)^{97,98,114,115} registran otras anomalías nucleares diferentes a MN en este epitelio. Entre estos estudios se encuentra el de Gonsebatt *et al.* (1997) quienes evaluaron la contaminación del aire urbano, que contiene concentraciones altas de gases como HAP, O₃, MP₁₀, SO₂, NO₂, NO_x, CO y Pb;⁹⁷ sin embargo, contrario a lo observado en nuestro estudio, no encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los biomarcadores MN, BrN y BN. Con esto se puede inferir que el humo de leña puede ser más genotóxico que la polución urbana. El estudio de Danielsen *et al.* (2011) en líneas celulares de pulmón muestra que el humo de leña es más tóxico que la polución urbana, sugiriendo que el incremento de esta toxicidad podría deberse a un mayor nivel de HAP en el humo de leña.²²²

Por el contrario, la frecuencia de TN-PN en nuestro estudio no mostró una diferencia significativa ($p = 0,277$), no obstante se observó que la frecuencia de este biomarcador disminuyó 36% en el grupo expuesto ($0,21 \pm 0,59$) en comparación al grupo referente ($0,33 \pm 0,72$) (**Tabla 3**). Esto puede deberse a que un mayor número de núcleos equivale a una mayor cantidad de ADN y por tanto un nivel de genotoxicidad más alto, lo que pudo inducir a las células TN-PN a un proceso apoptótico. Ningún artículo publicado hasta la fecha que evalúe exposiciones en el epitelio nasal mediante el Ensayo de MN u otras anomalías nucleares, nombra o reporta frecuencia de células TN-PN, con lo que podemos suponer que desconocen su existencia. Esto resulta extraño ya que de manera interesante, nosotras observamos que la frecuencia basal de TN-PN fue más alta en el grupo referente ($0,33 \pm 0,72$), e incluso superó la de MN ($0,22 \pm 0,34$), lo que indica que es un evento común y natural en este epitelio, siendo evidente y observable cuando las preparaciones citológicas son adecuadas (Tabla 3).

La presencia de células TN-PN se ha reportado en pocas células humanas, incluyendo hepáticas²²³, donde se dan como resultado del proceso natural mediante la fusión de células mononucleadas. En linfocitos, se ha observado por la inhibición de la citocinesis causada por la droga citocalasina B en células en división.²²⁴ Las células TN-PN en monocitos se han asociado con granulomas que surgen de reacciones inflamatorias como respuesta inmune del individuo a enfermedades infecciosas crónicas,²²⁵ mientras que en tejido muscular cardíaco se han

asociado con insuficiencia cardíaca.²²⁶ En tejidos epiteliales como el cervical y el cuello uterino, se dan por el mecanismo de fusión en consecuencia de infecciones virales como el Herpes (VHS-1 o VHS-2), el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1).²²⁷ El autor Ehya (2012) menciona que en el epitelio que recubre la tráquea se da este evento como respuesta al virus del Herpes (VHS-1 o VHS-2),²²⁸ y aunque este epitelio es similar al epitelio nasal, consideramos que no es recomendable extrapolar la significancia biológica de TN-PN ni sus mecanismos de formación ya que estos pueden ser distintos; como se puede observar por ejemplo, en los epitelios escamosos que recubren el cuello uterino y la boca, aunque presentan características semejantes, la formación de BN se da por procesos diferentes: en el primero según Gentric (2014) por fusión y en el segundo según Thomas (2009) por fallas en la citocinesis.^{176,227}

Hasta el momento, no se ha reportado en artículos, histologías o en estudios de cinética celular la existencia de TN-PN en el epitelio respiratorio nasal. El hallazgo de estas células representa un nuevo biomarcador que puede ser útil para evaluar el efecto temprano de exposiciones, por lo cual recomendamos que futuros estudios exploren su significancia y su inclusión en el Ensayo de Micronúcleos. Igualmente es de suma importancia realizar investigaciones que permitan conocer más sobre este biomarcador y sus mecanismos de formación. Nosotras proponemos que dichas células preceden de células binucleadas cuyos núcleos entran en mitosis en tiempos distintos, permitiendo la formación de células trinucleadas o polinucleadas.

En cuanto al índice de reparación (IR), se encontró una diferencia significativa ($p=0,000$) entre el grupo referente y el expuesto ($60,77\pm 91,61$ vs $90,35\pm 100,98$) (**Tabla 3**), sugiriendo que los mecanismos de reparación de las mujeres son elevados, lo que está acorde con Mondal *et al.* (2011) quienes encontraron que en mujeres expuestas al humo de biomasa, se presenta una excesiva estimulación de los mecanismos de reparación mediante la activación de las proteínas Mre11 y Ku70, las cuales están presentes en el sistema de reparación de extremos no homólogos (NHEJ) en células epiteliales y linfocitos.^{107,132} Bhattathiri *et al.* (2001) estudiaron pacientes con cáncer oral durante la radioterapia y propusieron que en el tejido tumoral, las frecuencias de BrN y MN puede ser tomadas como un índice de cariocinesis, lo que podría ser útil en la identificación de las características de proliferación de tumores durante el tratamiento.^{96,229}

Comparación de la sensibilidad entre el epitelio nasal y bucal

Mediante el análisis estadístico de t-Student para muestras relacionadas, se encontró que el epitelio nasal presentó más MN y BrN que el epitelio bucal tanto en el grupo expuesto como en el grupo referente (**Tabla 4**). Resultados similares fueron descritos por Titenko-Holland *et al.* (1996), Ying *et al.* (1997) y Bruschiweiler *et al.* (2014), quienes evaluaron exposiciones ocupacionales mediante la prueba de MN, encontrando frecuencias de MN más altas en células nasales que en bucales.^{111,112} Podría suponerse que el mecanismo por el cual se genera el daño en el epitelio nasal y el bucal es similar debido a que los compuestos generados por la combustión incompleta de la leña, entran por la cavidad nasal y bucal mediante la inhalación, se acumulan en los pulmones y pasan al torrente sanguíneo, a través del cual son llevados al tejido adyacente conectivo de los epitelios donde interactúan con las células basales produciendo el daño genotóxico.^{51,230} Sin embargo, debido a la diferencia en la estructura celular, la dosis biológicamente efectiva y la vulnerabilidad estos epitelios son distintos: El epitelio bucal está conformado 3 estratos (germinativo, espinoso y granuloso), los dos últimos están constituidos por células diferenciadas distribuidas entre 40 y 50 capas^{175,231} (**Fig. 6E**) presentando la última cierto grado de queratinización debido a roces por la masticación.^{167,232}

Estos factores, el continuo flujo de saliva y los hábitos de aseo del individuo, evitan la concentración de los compuestos en el epitelio y el contacto directo con el estrato germinativo. El epitelio respiratorio nasal está constituido por células basales y diferenciadas dispuestas en una sola capa celular, donde todas las células tocan el tejido conectivo (**Fig. 6C**). Esta capa está revestida con moco el cual junto con los cilios se encargan de la eliminación de toxinas y compuestos mediante un proceso de transporte denominado "escalera mucociliar".¹²³ Nosotras consideramos que en este epitelio el daño genotóxico es mayor, puesto que el contacto constante con el MP aumenta la concentración de los compuestos reduciendo la fluidez del moco provocando una reducción en la depuración mucociliar;^{57,174,233,234} del mismo modo puede generarse una disminución del moco causada por la citotoxicidad en glándulas mucosas o en células caliciformes que lo producen, hipótesis que coincide con los síntomas de reseca nasal reportados por las mujeres expuestas (**Tabla 1**). Las alteraciones en la cantidad y/o fluidez del moco, pueden permitir que los compuestos atraviesen con mayor facilidad la capa celular e interactúen con las células basales. Además de esto, podemos suponer que los compuestos tóxicos que viajan a través del torrente sanguíneo pueden generar daños en los cilios de las células columnares, alteraciones ciliares que según estudios provocan fallas en el proceso de la escalera mucociliar.^{32,235,236}

Durante la lectura de las preparaciones citológicas, se observó que los BrN del epitelio bucal eran más pronunciados y definidos, mostrando la forma típica de "huevos rotos", mientras que en el epitelio nasal eran simples proyecciones de los núcleos (**Fig. 3E y 4C**), características que identifica también Wulsch *et al.* (2013).^{114,115} Esta diferencia morfológica, podría explicarse con el tiempo de renovación de cada epitelio y su relación con los procesos de reparación: mientras las células basales del epitelio nasal tardan de 13 a 15 días en diferenciarse, las del epitelio bucal tardan de 7 a 21 días,¹⁵⁰ lo que podría sugerir, que el epitelio nasal presenta un proceso de reparación más eficiente en busca de mantener la integridad del epitelio ya que posee una única capa celular; en cambio el epitelio bucal al poseer más de 40 capas de células diferenciadas y estar en continua descamación,²³¹ no requiere de un sistema de reparación eficiente, optando por la eliminación de secuencias de ADN más grandes evidenciándose en brotes más pronunciados y definidos en comparación a los brotes de las células nasales.

A diferencia de los biomarcadores de genotoxicidad, BN presentó un aumento significativo en el epitelio bucal en relación al epitelio nasal en los dos grupos de estudio (**Tabla 4**). Esto podría deberse a que en el epitelio nasal algunas células BN se convierten en células TN-PN lo que disminuye la frecuencia de BN. La ausencia de TN-PN en el epitelio bucal y su alta frecuencia en el epitelio nasal, representa una gran diferencia entre ellos.

Con base en lo hallado en nuestro estudio, sugerimos que aunque todas las células sufren apoptosis, el epitelio respiratorio nasal no manifiesta los mismos eventos apoptóticos que el epitelio bucal, y por tanto los biomarcadores de muerte celular evaluados en el Ensayo Citómico bucal no son observables en células columnares nasales debido a las diferencias en la estructura y la cinética: en el proceso apoptótico del epitelio bucal, una vez la célula basal se diferencia, su núcleo se va degradando a medida que migra a través de las múltiples capas, encontrándose en el estrato espinoso eventos iniciales de la apoptosis (células cariorréticas, con cromatina condensada y picnóticas) y en el estrato granuloso los eventos finales de la apoptosis (células cariolíticas)¹⁵⁰ (**Fig. 6E**). Sin embargo, durante este proceso que dura de 7 a 21 días, el citoplasma se mantiene intacto aun cuando la célula llega al último estrato y se descama. Por otro lado, en el epitelio nasal no se lleva a cabo el proceso de migración celular, por lo cual, los núcleos no tienen oportunidad de transformarse y el proceso apoptótico se da en pocos minutos. Durante la apoptosis, las células pierden los cilios y las uniones superficiales reduciendo su tamaño; luego, los núcleos y el citoplasma se fragmentan simultáneamente

formando cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por las células adyacentes y células fagocíticas locales para su destrucción¹⁶⁹ (**Anexo 2**). Lo que nos lleva a suponer, que los biomarcadores de muerte celular estudiados por Wultsch *et al.* (2013), Mergener *et al.* (2014) y Gonsebatt *et al.* (1998), no fueron observados en células columnares del epitelio respiratorio sino en células escamosas del epitelio vestibular, ya que este último presenta el mismo tipo de células y una estratificación semejante a la del epitelio bucal (**Fig. 6D**); esto es deducible puesto que afirman haber obtenido la muestra de los dos epitelios y no especifican en qué tipo de células registraron los biomarcadores de muerte celular. Adicionalmente, ninguna de las cuatro (4) publicaciones cuentan con registro fotográfico que demuestre la existencia de estos eventos en las células columnares del epitelio respiratorio nasal.^{97,98,114,115} La ventaja de nuestro estudio es que la muestra celular fue exclusivamente de células columnares y pudimos concluir que estas anomalías no son observables, sin embargo, sería interesante indagar sobre el proceso apoptótico llevado a cabo en este epitelio con el fin de identificar las células en este estado.

Durante la estandarización de nuestro protocolo fue posible observar que la conservación celular es el factor más importante para una correcta identificación de biomarcadores de muerte celular en las células columnares del epitelio nasal; puesto que un inadecuado procesamiento y tinción como por ejemplo, dejar pasar muchas horas entre la toma y la fijación de las muestras, provoca una lisis celular que se caracteriza por presentar citoplasmas rasgados y núcleos que se confunden fácilmente con eventos apoptóticos como células con cromatina condensada y cariorréticas. Además, fijaciones con alcoholes al 80% y carnoy's producen una contracción nuclear que se asemeja a células picnóticas; por ende, la exposición de las muestras a estos factores de procesamiento podría estar generando falsos positivos (**Anexo 10B, 10D**). Por consiguiente, podríamos afirmar que si la degradación se observa sólo en el núcleo se trata de un evento apoptótico, pero si esta degradación afecta también al citoplasma, es claro que se trata de una lisis producto de un mal procesamiento y conservación de la muestra celular (**Anexo 10D**). Durante la estandarización, pudimos observar los efectos de estos factores sobre las células pero finalmente logramos mantener la integridad morfológica y estructural del citoplasmática y el núcleo de las células columnares. Con esto podemos concluir, que si los autores Wultsch *et al.* (2013), Mergener *et al.* (2014) y Gonsebatt *et al.* (1998) observaron estos eventos en células columnares, es muy posible que haya sido producto de fallas en la conservación celular. Apoyando nuestros hallazgos, Fenech *et al.* (2009) afirma: "La presencia de células degradadas en individuos sanos, explicaría las deficiencias de los procedimientos empleados y no los eventos apoptóticos generados por la exposición".⁵⁰

En conclusión, los resultados de nuestra investigación sugieren que el Ensayo de Micronúcleos en células nasales (células diana) es más sensible para evaluar el efecto genotóxico de agentes contaminantes en el aire en comparación con las células bucales. En concordancia con Bruschteiler *et al.* (2014), el epitelio nasal puede ser más sensible e ideal para estudios de inhalación, debido a una mayor exposición durante la respiración, ya que la mucosa nasal está diseñada para atrapar partículas que pueden acumularse en este tejido.¹¹⁶ Nuestros resultados sugieren el Ensayo de Micronúcleos en células nasales puede convertirse en una herramienta de vigilancia biológica relevante en un futuro para la detección temprana de riesgo de cáncer nasal. Es razonable afirmar, que las células con anomalías nucleares tales como BrN, BN y TN-PN, también pueden utilizarse con éxito como indicadores adicionales para la evaluación de la exposición ambiental al humo de leña. Varias investigaciones afirman que la utilización de células columnares del epitelio respiratorio nasal, son excelentes candidatas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* en animales y humanos para el esclarecimiento de la toxicidad de sustancias y para la certificación de fármacos en la industria.²³⁷⁻²⁴⁰

Frecuencias de los biomarcadores en relación a la edad, tiempo de exposición, tipo de hornilla, ubicación y ventilación de la cocina y la interacción entre estas características.

El análisis del efecto de la edad mostró un aumento de MN en el grupo referente tanto el epitelio nasal como el bucal, aunque en el nasal no fue significativo (**Gráfica 1A y 1D**). Según el metanálisis de Fenech (2011) y otros autores^{52,158,185,208,241-245} el daño en el ADN suele ser más alto en las personas mayores que en los jóvenes, manifestándose en un aumento de MN a partir de los 30 o 40 años. Esto podría deberse según Catalan *et al.* (1995), a que el envejecimiento cronológico de la mujer está claramente asociado con un aumento de la pérdida del cromosoma X que finaliza en la formación de MN, lo que sucede cerca de los 35 años.²⁴⁶ Por el contrario la frecuencia de MN tuvo una tendencia a disminuir con la edad en los dos epitelios del grupo expuesto (**Gráfica 1B y 1E**), lo que coincide con algunos autores quienes evalúan exposiciones comparables con el humo de leña tales como HAP y humo de tabaco empleando biomarcadores de genotoxicidad.^{193,247,248} Aunque en todas las mujeres a medida que aumenta la edad se da la pérdida del cromosoma X, el deterioro progresivo de la capacidad de reparación y un aumento de la resequedad en la mucosa nasal y oral,^{215,246,249} en mujeres que cocinan con leña la resequedad bucal es más aguda debido a los xenobióticos presentes en este.⁷⁹ Esta condición podría causar que estos compuestos se acumulen y penetren con mayor facilidad las capas celulares, entrando en contacto con el estrato germinativo y produciendo un aumento del daño genotóxico el cual activa los procesos apoptóticos como mecanismo de defensa para eliminar las lesiones primarias y evitar que se conviertan en mutaciones,¹⁴ lo que se refleja en un aumento de células apoptóticas como las cariolticas (datos no mostrados) y una disminución de células con micronúcleos al asociarlas con la edad. De acuerdo al análisis de correlaciones entre la variable tiempo de exposición y los biomarcadores de estudio, nuestros resultados indican un aumento significativo de BN en el epitelio bucal con los años de exposición y en el epitelio nasal con las horas de exposición, sin embargo el daño genotóxico no se vio aumentado por la intensidad de la exposición (**Gráfica 1C y 1F**). De igual forma, las mujeres expuestas más de 36 años, mostraron una diferencia significativa de BN en el epitelio bucal comparada con las expuestas menos de 36 años. Esta diferencia podría atribuirse a que un mayor tiempo de exposición al humo de leña podría estar generando un inadecuado ensamblaje de la maquinaria de división celular al interactuar con la miosina; al no existir una coordinación espacial de la citoquinesis, se producirá una inestabilidad genética en la cual cada núcleo obtendrá un conjunto inexacto de cromosomas, evento que detendrá la división celular y provocará la presencia de células binucleadas.²⁵⁰ El epitelio bucal al ser estratificado, requiere de una mayor exposición para reflejar el daño,¹⁹² mientras que el nasal sólo es necesario una exposición aguda para ver el efecto de la exposición. El biomarcador Cr por el contrario, se vio disminuido en mayores de 36 años (**Tabla 6**), lo cual concuerda con Ramírez y Saldana (2002) quienes informan que si bien la frecuencia de Cr aumenta tras una exposición abrupta, luego comienza a descender paulatinamente, lo que representa un desorden en la dinámica del epitelio y en el proceso de descamación.¹⁶⁴

Las condiciones de la vivienda de las mujeres que conformaron nuestro grupo expuesto, agravaron el efecto tóxico del humo de leña, ya que la mayoría de las mujeres tenían la cocina ubicada al interior de la vivienda, con poca ventilación, y hornillas de combustión abierta. Además al igual que en un estudio en la India,³⁵ nosotras observamos que la concentración de hollín y por ende de MP (**Anexo 15C, 15D**), está asociado directamente con la ubicación de la cocina en la vivienda. Se observó que la cocina al interior de la vivienda presenta aberturas en las paredes y el techo (**Anexo 15A, 15B**), lo que facilita el paso del humo al resto de la vivienda contribuyendo a un aumento de la exposición, que se ve reflejado en un incremento marginal de la frecuencia de CI en el epitelio bucal ($p=0,063$), la cual ha sido asociada con la muerte celular después de una lesión por agentes que causan perturbación del medio ambiente celular,²⁵¹

además, podrían vincularse según Holland *et al.* (1994) y Joshi *et al.* (2010) a un efecto citotóxico, apoptótico y necrótico causado por el humo de leña.^{212,252} Esta anomalía nuclear es intrínseca al epitelio escamoso, puesto que se produce por el efecto crónico del proceso de masticación, sin embargo por la acción constante de agentes mutagénicos tales como el humo de leña se ve aumentada la tasa de este biomarcador.^{35,212}

En mujeres con una cocina con escasa ventilación se presentó un aumento significativo de MN en los epitelios al compararla con una moderada ventilación, lo cual podría deberse a que en viviendas con escasa, los niveles de exposición al humo de leña superan 10, 20 o más veces los recomendados por la OMS.³⁷ El MP_{2,5} y MP₁₀ formado por la condensación de los gases producto de la combustión incompleta del humo de leña, se dispersa rápidamente, de tal manera que al permanecer muchas horas prendido el fogón y no tener la cocina una adecuada ventilación, este MP se adhiere a las superficies porosas como madera y barro,^{253,254} los cuales son los principales materiales de construcción de las cocinas de las mujeres expuestas de nuestro estudio.

Igualmente, las hornillas abiertas propiciaron un aumento de BrN, posiblemente porque este tipo de estufa no quema los combustibles por completo, emitiendo una gran cantidad de partículas y gases tóxicos como el monóxido de carbono (CO) (del cual se ha estimado se produce entre 10-180 gramos por kg de leña), los cuales son retenidos en las paredes en forma de hollín y absorbidos por las mujeres.^{13,37,121,255-257} El efecto de la exposición al humo de leña modulado por el tipo de hornilla ha sido evaluado en algunos estudios y se ha encontrado que niños menores de 5 años que viven en hogares con cocina tradicional, tienen mayor riesgo de padecer infecciones respiratorias agudas y conjuntivitis en relación a niños que viven en hogares con cocinas mejoradas.^{254,258} En general las estufas tradicionales son ineficientes y generan problemas de salud, razón por la cual se han planteado variados diseños para mejorar su eficiencia y minimizar los riesgos.^{255,256}

Mediante el análisis de interacciones fue posible observar que el efecto de la exposición puede ser disminuido si las cocinas presentan una hornilla con chimenea pero con una ventilación escasa para evitar que el humo saliente hacia el exterior reingrese por las ventanas. Igualmente si se tiene una hornilla de combustión abierta es necesario que la cocina se encuentre en el exterior de la vivienda y presente una adecuada ventilación, ya que según Velásquez y Zavala separar la cocina de la casa y mejorar la ventilación permitiría reducir la exposición.²⁵⁸ Por otro lado, si se presentan la cocina al interior de la vivienda es preferible que esta tenga chimenea en lugar de ser una hornilla de combustión abierta, evitando que las mujeres continúen exponiéndose a los compuestos que son retenidos dentro de la vivienda, ya que el mayor tiempo del día ellas se encuentran en el hogar; es por esto que Jan (2012) sugiere que las estufas que no poseen chimenea, deberían estar al aire libre o en zonas abiertas (**Gráfica 2A y 2B**).⁶¹

Estos hallazgos proponen que la intervención en todos o algunos de estos factores, puede disminuir considerablemente el nivel de exposición y por ende la carga de la enfermedad. Akunne *et al.* (2006), encontraron que 56% de las Infecciones Respiratorias Agudas se pueden explicar por la carencia de ventilación. Al mejorar la ventilación la fracción atribuible se reduce a un 21.7%, si se mejoran las hornillas volviéndolas más eficientes, se reduce a 25.0% y si las familias se animan a cocinar al aire libre se puede reducir al menos en un 50%;²⁵⁹ concluyendo que las estrategias preventivas para la reducción de la contaminación del aire interior de las viviendas debieran incluir el aumento de la ventilación, la ubicación de la cocina y la implementación de hornillas mejoradas.²⁵⁸

En cuanto al efecto de la actividad física, aun cuando no fue significativo, aquellas mujeres con una actividad física mayor a 7 horas semanales presentaron una mayor frecuencia de todos los biomarcadores evaluados en los epitelios, esto concuerda con varios estudios que afirman que el ejercicio exhaustivo incrementa la generación de diversas formas de radicales libres de oxígeno debido a la excesiva absorción de oxígeno, provocando modificaciones oxidativas de los lípidos, proteínas y ADN, lo que explicaría el aumento de la frecuencia de los biomarcadores en las mujeres^{199,260-263} (**Tablas 5 y 6**).

Efecto de la dieta sobre las frecuencias de los biomarcadores de los epitelios nasal y bucal

En nuestro estudio se encontró que las mujeres expuestas que nunca consumieron pescado tienen un aumento significativo de MN en el epitelio nasal en relación a las que lo consumen semanalmente, probablemente por los efectos anti-inflamatorios de aceite de pescado,²⁶⁴ el cual presenta hidroxitiroso, un compuesto fenólico antioxidante que inhibe la formación de productos de oxidación de lípidos.²⁶⁵ Igualmente, estudios han observado que el aceite de pescado tiene un papel protector en los acontecimientos tempranos de la carcinogénesis mediante la modulación de enlaces cruzados proteína-ADN, la proliferación celular y la expresión de p53.^{266,267} En cuanto al consumo de frutas y verduras se encontró una disminución de CI en mujeres que presentaron un alto consumo de esos alimentos, los cuales poseen altos niveles de vitaminas A, C y complejo B, que inhiben eventos genotóxicos en las células de la mucosa bucal al actuar como compuestos antioxidantes y antimutagénicos.^{200,268}

Correlaciones entre los biomarcadores del grupo expuesto

El análisis de correlaciones indicó que en el epitelio nasal la frecuencia de MN aumenta junto con la frecuencia de BrN con una asociación significativa del 6% (**Tabla 8**), debido a que estos últimos son un mecanismo celular por el cual las células eliminan amplificaciones de ADN que finalizan en MN.^{150,155} Igualmente, el encontrar una asociación significativa del 9% entre BN y TN-PN apoya nuestra hipótesis planteada anteriormente en la que afirmamos que las células TN-PN surgen a partir de células binucleadas. Por otro lado, se observó una asociación negativa del 17% entre BrN y BN, esto podría deberse a que las células BN se forman como consecuencia de la perturbación citocinética y al desequilibrio del ADN por la exposición al humo de leña, pero durante la eliminación de las amplificaciones, podrían descartarse genes implicados en este desarrollo, obteniendo como resultado un decremento de la frecuencia de BN.²⁰⁶

En nuestro estudio se encontró que la frecuencia de BrN en el epitelio bucal está relacionado con un aumento del 7% de Cr al igual que lo reportado por Diler & Ergene,²⁶⁹ Tolbert *et al.* (1992) informaron de que la cariorrexis se asocia tanto con citotoxicidad (necrosis y queratinización) como con genotoxicidad.¹⁷⁸ Por otro lado, se encontró una asociación positiva entre las células Pn y Cc, lo cual, según Thomas *et al.* (2008) se debe a que las células Pn se derivan directa o indirectamente de las células Cc.¹⁶³ Igualmente, podríamos suponer que los mecanismos de reparación de las mujeres expuestas no fueron eficientes, ya que se encontraron asociaciones negativas entre los biomarcadores de genotoxicidad (MN y BrN) y citotoxicidad (BN) con el IR.

En los resultados del presente estudio se concluye que el humo de leña tiene un potencial genotóxico y citotóxico que provoca las anomalías nucleares en las células de la mucosa nasal

y bucal. Estos hallazgos exponen la importancia de estandarizar el proceso de colección, procesamiento de células nasales columnares así como la identificación de los biomarcadores para que se produzcan resultados reproducibles que contribuyan a su validación, siendo aplicable para el desarrollo de una amplia gama de estudios ambientales y ocupacionales, y para la identificación de grupos en mayor riesgo. Además fomentan el establecimiento de actividades tendientes a mejorar las condiciones de vida y salud de las mujeres mediante la realización de charlas y cursos de socialización de resultados que permiten motivar a la población hacia un cambio de actitud frente a prácticas diarias que pueden llevar a una reducción significativa de la exposición al humo de leña, como una estrategia inicial de prevención y promoción de la salud.

Los resultados de esta investigación se constituyen en evidencia científica que justifican el desarrollo de proyectos de mayor escala que contribuyan a la implementación de estufas de alto rendimiento, contratos de subsidio de gas y/o electricidad o la implementación de energías renovables que permitan no solo disminuir la exposición sino también la tala de árboles y la contaminación ambiental. El conocimiento generado en esta investigación será socializada a través de eventos que permitan a actores comprometidos con el mejoramiento de la salud a nivel regional y nacional, informarse sobre la problemática que genera la exposición al humo de leña y aportar información demográfica valiosa para los sistemas de vigilancia epidemiológica nacionales como SIVIGILIA, así mismo, esta información puede aportar al Análisis de Situación de Salud en Colombia ASIS para la toma de acciones.^{270,271}

9. CONCLUSIONES

El presente estudio reveló la existencia del biomarcador TN-PN en el epitelio nasal, el cual hasta la fecha no ha sido evaluado ni nombrado en estudios de biomonitorio citogenéticos, por lo que se hace un gran aporte a la literatura.

Los procesos apoptóticos dados en el epitelio respiratorio nasal, son totalmente diferentes a los del epitelio bucal, aspecto que es desconocido por autores que han evaluado anomalías de muerte celular en el epitelio respiratorio nasal.

El aumento altamente significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de los biomarcadores evaluados en el grupo expuesto con respecto al grupo referente, sugiere un efecto genotóxico, citotóxico y apoptótico producido por los compuestos presentes en el humo de leña sobre las células de los epitelios nasal y bucal.

Se pudo observar que en el epitelio nasal de las mujeres expuestas al humo de leña el daño genotóxico ($4,28 \pm 2,29$) fue mayor que el daño citotóxico ($3,17 \pm 2,17$), mientras que en el epitelio bucal se observó un efecto inverso (daño genotóxico: $1,53 \pm 1,32$; daño citotóxico: $4,20 \pm 2,87$).

El epitelio respiratorio nasal es más sensible que el epitelio bucal y por tanto, la evaluación de los efectos de la exposición a agentes genotóxicos mediante los biomarcadores estudiados puede llegar a ser una herramienta útil para determinar los riesgos de la salud asociados con inestabilidad genómica.

El tiempo de exposición es una importante variable que modula el efecto citotóxico y apoptótico causado por el humo de leña en el sistema respiratorio de las mujeres expuestas; observándose un aumento significativo ($p < 0,05$) de la frecuencia del biomarcador BN y Cr a medida que el tiempo de exposición aumenta.

Las características de la infraestructura de las cocinas de las mujeres modulan la frecuencia de los biomarcadores; observándose que cocinas al exterior de las viviendas, mejorar la ventilación de las cocinas y la implementación de hornillas con chimenea permitiría disminuir el efecto de la exposición al humo de leña.

La dieta modula la genotoxicidad y apoptosis producida por los compuestos presentes en el humo de leña, ya que las mujeres expuestas con un bajo consumo de los alimentos evaluados presentaron una mayor frecuencia de los biomarcadores de daño en el ADN y muerte celular en relación a las mujeres con un alto consumo.

Mediante este estudio se demuestra la necesidad de que entidades gubernamentales desarrollen proyectos que contribuyan a mejorar las condiciones de vida y vivienda de las mujeres que cocinan con leña, implementando el uso de estufas de alto rendimiento y combustibles más saludables que permitan disminuir el nivel de la exposición.

Este estudio aporta conocimiento científico sobre el efecto del humo de leña en los epitelios nasal y bucal, así como variables que modulan la frecuencia de los biomarcadores, lo que podría contribuir a la validación de la prueba Citómica en estos epitelios.

10. RECOMENDACIONES

Realizar estudios que permitan generar conocimiento sobre la cinética del epitelio nasal y la formación de las células TN-PN, así como la posible implementación de estas células como un biomarcador de efecto para evaluar exposiciones ambientales y ocupacionales.

Identificar y reconocer el proceso apoptótico que se desarrolla en el epitelio nasal, con el fin de establecer posibles biomarcadores de muerte celular que proporcionen información valiosa sobre el efecto de las exposiciones ambientales ocupacionales.

Determinar las concentraciones de los compuestos presentes en el humo de leña acumulado en los hogares mediante el empleo de filtros; así como las concentraciones internas de los metabolitos en sangre y orina mediante biomarcadores de exposición, para establecer correlaciones con los biomarcadores de efecto temprano evaluados en el epitelio nasal y bucal.

Emplear sondas de hibridación “in situ” (FISH), que permitan identificar el origen de los Micronúcleos a partir de rupturas cromosómicas o de cromosomas enteros perdidos, con el fin de conocer realmente el efecto de la exposición al humo de leña y sus metabolitos.

Evaluar la función pulmonar de las mujeres expuestas al humo de leña con el fin de conocer su efecto sobre el sistema respiratorio y su correlación con la frecuencia de los biomarcadores en los epitelios nasal y bucal.

Implementación de un software automático para realizar un registro uniforme y homogéneo de los biomarcadores en el epitelio nasal y bucal.

Identificar la susceptibilidad genética de las mujeres expuestas al humo de leña por medio de polimorfismos en genes de reparación o del metabolismo, con el fin de conocer factores genéticos que afecten la frecuencia de los biomarcadores evaluados en el epitelio nasal y bucal.

Emplear una muestra poblacional más grande con el fin de darle una mayor potencia a la prueba y que la investigación sea equivalente a un estudio epidemiológico clásico. Del mismo modo un aumento del tamaño poblacional permitiría evaluar el efecto de la interacción de las tres variables de la infraestructura estudiada.

Incluir marcadores informativos de ancestría, con el fin de conocer si existe una asociación entre el componente ancestral de la población de estudio, la frecuencia de los biomarcadores y la exposición al humo de leña.

Se necesitan estudios de gran tamaño poblacional para confirmar los hallazgos del presente estudio, con el fin de aportar a la construcción de conocimiento sobre el daño causado por esta exposición y comprender como los factores de riesgo ambientales influyen en el desarrollo y progresión de enfermedades dando lugar a mejoras en la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Rehfuess, E. *Energia domestica y salud/fuel For Life: Combustibles para una vida mejor/Household Energy and Health*. (World Health Organization, 2007).
- 2 Ramirez, M. *et al.* Presencia de estrés oxidativo en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducido con exposición a humo de leña en cobayos. *Revista del Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias* **22** (2009).
- 3 Johnson, A. & Aderere, W. The association of household pollutants and socio-economic risk factors with the short-term outcome of acute lower respiratory infections in hospitalized pre-school Nigerian children. *Annals of Tropical Paediatrics* **12**, 421 (1992).
- 4 Orozco Hormaza, M. Contributions of psychology to the Colombian's children problems. *Interamerican Journal of Psychology* **42**, 487-498 (2008).
- 5 DANE. Encuesta de calidad de vida del año 2008. (2008).
- 6 Moreira, M. *et al.* Comparative study of respiratory symptoms and lung function alterations in patients with chronic obstructive pulmonary disease related to the exposure to wood and tobacco smoke. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **34**, 667-674 (2008).
- 7 Park, M. *et al.* Assessment of oxidative stress in lungs from sheep after inhalation of wood smoke. *Toxicology* **195**, 97-112 (2004).
- 8 Weininger, S. J. & Stermitz, F. R. *Química orgánica*. (Reverté©, 1988).
- 9 Bruce, N., Perez-Padilla, R. & Albalak, R. Contaminación del aire de locales cerrados en los países en desarrollo: un importante reto ambiental y de salud pública. *Relation* **4**, 38-52 (2001).
- 10 Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. & Bonassi, S. The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **428**, 271-283 (1999).
- 11 Naeher, L. *et al.* Woodsmoke health effects: a review. *Inhalation Toxicology* **19**, 67-106 (2007).
- 12 Rinne, S. *et al.* Relationship of pulmonary function among women and children to indoor air pollution from biomass use in rural Ecuador. *Respiratory medicine* **100**, 1208-1215 (2006).
- 13 Kim, K.-H., Jahan, S. A. & Kabir, E. A review of diseases associated with household air pollution due to the use of biomass fuels. *Journal of Hazardous Materials* **192**, 425-431 (2011).
- 14 Jerneck, A. & Olsson, L. A smoke-free kitchen: initiating community based co-production for cleaner cooking and cuts in carbon emissions. *Journal of Cleaner Production* **60**, 208-215 (2013).
- 15 Smith, K. R. *Biofuels, air pollution, and health: a global review*. (Plenum Press, 1987).
- 16 Orozco-Levi, M. *et al.* Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* **27**, 542-546 (2006).
- 17 DANE. Análisis de la estructura y composición de las principales variables demográficas y socioeconómicas del Censo 2005. (2005).
- 18 Bank., W. Republic of Colombia - Mitigating environmental degradation to foster growth and reduce inequality. *Washington, DC: World Bank*. (2006).
- 19 Bruce, N., Perez-Padilla, R. & Albalak, R. Contaminación del aire de locales cerrados en los países en desarrollo: un importante reto ambiental y de salud pública. *Bull World Health Organ*, 1078-1092 (2001).
- 20 Li, Z. *et al.* Evaluation of exposure reduction to indoor air pollution in stove intervention projects in Peru by urinary biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. *Environment international* **37**, 1157-1163 (2011).
- 21 Koo, C., Gupta, N., Baliff, J., Hudock, K. & Haas, A. A tale of two sisters: Biomass fuel exposure-related lung disease. *Clinical radiology* **66**, 190-193 (2011).
- 22 IARC. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Household Use of Solid Fuels and High-temperature Frying*. Vol. 95 (Iarc, 2010).
- 23 OMS, O. (OMS Ginebra, 2012).
- 24 OMS. The World health report: 2002: Reducing the risks, promoting healthy life. (2002).
- 25 OMS. *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. (World Health Organization, 2009).

- 26 Caballero, A. *et al.* Caracterización epidemiológica de una población de pacientes del programa «manejo integral de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica» de la EPS Sanitas en Bogotá. *Revista Colombiana de Neumología* **20** (2008).
- 27 OMS. Nuevos datos de los países muestran la pesada carga de la contaminación del aire en espacios cerrados. *Centro de prensa* (2007).
- 28 Velandia, M., Rey, G. & De la Hoz, F. Consideraciones para la introducción de la vacuna contra influenza en Colombia. *Inf Quinc Epidemiol Nac* **12**, 97-112 (2007).
- 29 Suhas, S. & Ganapathy, K. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **561**, 15-21 (2004).
- 30 Marisol, R. H. & Rafael, O. G. Prevalencia de tumoraciones de nariz y senos paranasales en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” de enero de 1994 a diciembre de 2002. **50 N° 1** (2005).
- 31 IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **95** (2010).
- 32 Demircigil, G. C. *et al.* Increased micronucleus frequencies in surrogate and target cells from workers exposed to crystalline silica-containing dust. *Mutagenesis* **25**, 163-169 (2010).
- 33 Sungu, Y., ÇINAR, Z., AKKURT, ÖZDEM R, Ö. & SEYF KL , Z. Sister-chromatid Exchange Frequency in Women Who Exposed to Biomass in a Village of Central Anatolia. *Turk Resp J* **2**, 2628 (2001).
- 34 Musthapa, M. S. *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Indian women cooking with biofuels: micronucleus and chromosomal aberration tests in peripheral blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis* **43**, 243-249 (2004).
- 35 Mondal, N. K., Mukherjee, B., Das, D. & Ray, M. R. Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **697**, 47-54 (2010).
- 36 OMS & OPS. Salud en las Américas: Panorama regional y perfiles de país. *Revista Gerencia y Políticas de Salud* **12**, 267-275 (2012).
- 37 CEPIS, OPS, GTZ & DIGESA. (2004).
- 38 Naranjo, F. & de Gestión, C. S. La problemática de la salud, en relación con las cocinas de leña en áreas rurales a nivel mundial. (2010).
- 39 Arnold, M., Köhlin, G., Persson, R. & Shepherd, G. *Fuelwood Revisited: What has changed in the last decade?* , (CIFOR, 2003).
- 40 Barnes, D. F., Openshaw, K., Smith, K. R., Van der Plas, R. & Mundial, B. *What Makes People Cook with Improved Biomass Stoves?* , (Banco Mundial, 1994).
- 41 García-Frapolli, E. *et al.* Beyond fuelwood savings: Valuing the economic benefits of introducing improved biomass cookstoves in the Purépecha region of Mexico. *Ecological Economics* **69**, 2598-2605 (2010).
- 42 Granderson, J., Sandhu, J. S., Vasquez, D., Ramirez, E. & Smith, K. R. Fuel use and design analysis of improved woodburning cookstoves in the Guatemalan Highlands. *biomass and bioenergy* **33**, 306-315 (2009).
- 43 Masera, O. *et al.* Impact of Patsari improved cookstoves on indoor air quality in Michoacán, Mexico. *Energy for Sustainable Development* **11**, 45-56 (2007).
- 44 Uribe, A. G. *et al.* Plan Decenal de Salud Pública 2012 - 2021. *República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social Grupo de Comunicaciones, Imprenta Nacional de Colombia* (2013).
- 45 GTZ. (ed Cooperación República de Colombia-República Federal de Alemania) (Bogotá, Departamento Nacional de Planeación, Programa de Naciones Unidas para el desarrollo, Equipo Técnico del Programa Nacional de desarrollo Humano, 2006).
- 46 Knasmueller, S. *et al.* Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies. *Mutagenesis* **26**, 231 (2011).
- 47 Sanchez-Siles, M., Ros-Llor, I., Camacho-Alonso, F. & Lopez-Jornet, P. A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Archives of Oral Biology* **56**, 1148-1153 (2011).
- 48 Tucker, J. D. & Preston, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **365**,

- 147-159 (1996).
- 49 El-Zein, R., Vral, A. & Etzel, C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* **26**, 101-106 (2011).
- 50 Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. & Bonassi, S. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **428**, 271-283 (1999).
- 51 Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M. & Bonassi, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **705**, 11-19 (2010).
- 52 Fenech, M. *et al.* The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis* **26**, 239-245 (2011).
- 53 Holland, N. *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **659**, 93-108 (2008).
- 54 Fenech, M. *et al.* HUMN project initiative and review of validation, quality control and prospects for further development of automated micronucleus assays using image cytometry systems. *International journal of hygiene and environmental health* **216**, 541-552 (2013).
- 55 Galindo, G., Cabrera, E., Otero García, J., Bernal, N. R. & Palacios, S. Planificación ecorregional para la conservación de la biodiversidad en los Andes y el Piedemonte amazónico colombianos. (2009).
- 56 Bickel, S. E. *et al.* Guía Ambiental de USAID, Buró de Latinoamérica y el Caribe (2003).
- 57 Torres-Duque, C., Maldonado, D., Pérez-Padilla, R., Ezzati, M. & Viegi, G. Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 577-590 (2008).
- 58 Reisen, F. *et al.* Impact of smoke from biomass burning on air quality in rural communities in southern Australia. *Atmospheric Environment* **45**, 3944-3953 (2011).
- 59 Pierson, W., Koenig, J. & Bardana Jr, E. Potential adverse health effects of wood smoke. *Western Journal of Medicine* **151**, 339 (1989).
- 60 Naeher, L. P. *et al.* Woodsmoke health effects: a review. *Inhalation toxicology* **19**, 67-106 (2007).
- 61 Jan, I. What makes people adopt improved cookstoves? Empirical evidence from rural northwest Pakistan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**, 3200-3205 (2012).
- 62 Hine, D. W., Bhullar, N., Marks, A. D., Kelly, P. & Scott, J. G. Comparing the effectiveness of education and technology in reducing wood smoke pollution: A field experiment. *Journal of Environmental Psychology* **31**, 282-288 (2011).
- 63 L'Orange, C., Volckens, J. & DeFoort, M. Influence of stove type and cooking pot temperature on particulate matter emissions from biomass cook stoves. *Energy for Sustainable Development* **16**, 448-455 (2012).
- 64 Johnson, M., Lam, N., Brant, S., Gray, C. & Pennise, D. Modeling indoor air pollution from cookstove emissions in developing countries using a Monte Carlo single-box model. *Atmospheric Environment* **45**, 3237-3243 (2011).
- 65 Fitzgerald, C. *et al.* Testing the effectiveness of two improved cookstove interventions in the Santiago de Chuco Province of Peru. *Science of The Total Environment* **420**, 54-64 (2012).
- 66 Pokhrel, A. K., Smith, K. R., Khalakdina, A., Deuja, A. & Bates, M. N. Case-control study of indoor cooking smoke exposure and cataract in Nepal and India. *International Journal of Epidemiology* **34**, 702-708 (2005).
- 67 Alfheim, I. & Ramdahl, T. Contribution of wood combustion to indoor air pollution as measured by mutagenicity in Salmonella and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration. *Environmental Mutagenesis* **6**, 121-130 (1984).
- 68 Asita, A. *et al.* Mutagenicity of wood smoke condensates in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research Letters* **264**, 7-14 (1991).
- 69 Grigg, J. Effect of biomass smoke on pulmonary host defence mechanisms. *Paediatric Respiratory Reviews* **8**, 287-291 (2007).
- 70 Thorning, D. R., Howard, M. L., Hudson, L. D. & Schumacher, R. L. Pulmonary responses to smoke inhalation: Morphologic changes in rabbits exposed to pine wood smoke. *Human*

- pathology* **13**, 355-364 (1982).
- 71 Michael, J. A. B. D. W. Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **54**, 579-591 (1998).
- 72 Brizio-Molteni, L. *et al.* Effect of wood combustion smoke inhalation on angiotensin-1-converting enzyme in the dog. *Annals of Clinical & Laboratory Science* **14**, 381-389 (1984).
- 73 Lin, Y. S., Ho, C.-Y., Tang, G.-J. & Kou, Y. R. Alleviation of wood smoke-induced lung injury by tachykinin receptor antagonist and hydroxyl radical scavenger in guinea pigs. *European Journal of Pharmacology* **425**, 141-148 (2001).
- 74 Wong, K., Stock, M., Malek, D. & Alarie, Y. Evaluation of the pulmonary effects of wood smoke in guinea pigs by repeated CO₂ challenges. *Toxicology and Applied Pharmacology* **75**, 69-80 (1984).
- 75 Mumford, J. L., Helmes, C. T., Lee, X., Seidenberg, J. & Nesnow, S. Mouse skin tumorigenicity studies of indoor coal and wood combustion emissions from homes of residents in Xuan Wei, China with high lung cancer mortality. *Carcinogenesis* **11**, 397-403 (1990).
- 76 Liang, C., Quan, N., Cao, S., He, X. & Ma, F. Natural inhalation exposure to coal smoke and wood smoke induces lung cancer in mice and rats. *Biomedical and environmental sciences: BES* **1**, 42-50 (1988).
- 77 Tesfaigzi, Y. *et al.* Health effects of subchronic exposure to low levels of wood smoke in rats. *Toxicological Sciences* **65**, 115-125 (2002).
- 78 Pintos, J., Franco, E. L., Kowalski, L. P., Oliveira, B. V. & Curado, M. P. Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aero-digestive tract: a case-control study. *International Journal of Epidemiology* **27**, 936-940 (1998).
- 79 Ellegård, A. Cooking fuel smoke and respiratory symptoms among women in low-income areas in Maputo. *Environmental Health Perspectives* **104**, 980 (1996).
- 80 Rinne, S. T. *et al.* Relationship of pulmonary function among women and children to indoor air pollution from biomass use in rural Ecuador. *Respiratory medicine* **100**, 1208-1215 (2006).
- 81 da Silva, L. F. F., Saldiva, S. R. D. M., Saldiva, P. H. N. & Dolnikoff, M. Impaired lung function in individuals chronically exposed to biomass combustion. *Environmental research* **112**, 111-117 (2012).
- 82 Diaz, J. V., Koff, J., Gotway, M. B., Nishimura, S. & Balmes, J. R. Case report: a case of wood-smoke-related pulmonary disease. *Environmental Health Perspectives*, 759-762 (2006).
- 83 Chaves, R. C. & Rodríguez, C. J. A. NEUMOPATIA ASOCIADA A LA INHALACION DE HUMO DE LEÑA Análisis de 11 casos.
- 84 Dermis, R. J. Exposición a humo de leña y riesgo de enfermedad pulmonar obstructiva en mujeres. (1996).
- 85 Moreira, M. A. C. *et al.* Comparative study of respiratory symptoms and lung function alterations in patients with chronic obstructive pulmonary disease related to the exposure to wood and tobacco smoke. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **34**, 667-674 (2008).
- 86 Kim, Y. J., Jung, C. Y., Shin, H. W. & Lee, B. K. Biomass smoke induced bronchial anthracofibrosis: presenting features and clinical course. *Respiratory medicine* **103**, 757-765 (2009).
- 87 Ekici, A. *et al.* Obstructive airway diseases in women exposed to biomass smoke. *Environmental research* **99**, 93-98 (2005).
- 88 Banerjee, M., Siddique, S., Dutta, A., Mukherjee, B. & Ranjan Ray, M. Cooking with biomass increases the risk of depression in pre-menopausal women in India. *Social Science & Medicine* **75**, 565-572 (2012).
- 89 Velema, J. P. *et al.* Burning wood in the kitchen increases the risk of cervical neoplasia in HPV-infected women in Honduras. *International Journal of Cancer* **97**, 536-541 (2002).
- 90 Dandara, C., Li, D.-P., Walther, G. & Parker, M. I. Gene-environment interaction: the role of SULT1A1 and CYP3A5 polymorphisms as risk modifiers for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Carcinogenesis* **27**, 791-797 (2006).
- 91 Sierra Torres, C. H., Acosta Aragón, M. P. & Orejuela Aristizabal, L. Papilomavirus y Factores asociados a Neoplasia Intraepitelial Cervical de Alto Grado en Cauca, Colombia. *Revista de Salud Pública* **8**, 47-58 (2006).
- 92 Cajas, N., Hoyos, L. & Sierra, H. Efecto de los polimorfismos GSTT1, GSTM1 Y CYP2E1 en la

- susceptibilidad genética para el desarrollo de cáncer de pulmón en el departamento del Cauca. (2005).
- 93 Pandey, A. K. *et al.* DNA damage in lymphocytes of rural Indian women exposed to biomass fuel smoke as assessed by the Comet assay. *Environmental and molecular mutagenesis* **45**, 435-441 (2005).
- 94 Torres-Dosal, A. *et al.* Indoor air pollution in a Mexican indigenous community: evaluation of risk reduction program using biomarkers of exposure and effect. *Science of The Total Environment* **390**, 362-368 (2008).
- 95 Torres-Bugar *et al.* Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. *Disease Markers* **2014**, 13, doi:10.1155/2014/956835 (2014).
- 96 Nersesyán, A. K. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutation research* **588**, 64 (2005).
- 97 Gonsebatt, M. *et al.* Micronucleus (MN) frequency in nasal respiratory epithelium cells from young adults living in urban areas with different levels of air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **379**, S198 (1997).
- 98 Mergener, M., Rhoden, C. R. & Amantéa, S. L. Nuclear abnormalities in cells from nasal epithelium: a promising assay to evaluate DNA damage related to air pollution in infants. *Jornal de pediatria* (2014).
- 99 Ballarin, C. *et al.* Frequency of Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **280**, 1-7 (1991).
- 100 Ballarin, C., Sarto, F., Giacomelli, L., Bartolucci, G. B. & Clonfero, E. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **280**, 1-7 (1992).
- 101 Burgaz, S., Cakmak, G., Erdem, O., Yilmaz, M. & Karakaya, A. Micronuclei frequencies in exfoliated nasal mucosa cells from pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Neoplasma* **48**, 144-147 (2000).
- 102 Sherwani, R., Siddiqui, R. A., Khan, M. K. & Sharma, S. Nasal mucosa changes in students exposed to formaldehyde vapour. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* **54**, 18-19 (2002).
- 103 Burgaz, S. *et al.* Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **521**, 47-56 (2002).
- 104 Godderis, L. *et al.* Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. *Environmental and molecular mutagenesis* **44**, 293-303 (2004).
- 105 Ye, X., Yan, W., Xie, H., Zhao, M. & Ying, C. Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde exposed workers and low-level short-term exposed waiters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **588**, 22-27 (2005).
- 106 Huvinen, M. *et al.* Nasal cell micronuclei, cytology and clinical symptoms in stainless steel production workers exposed to chromium. *Mutagenesis* **17**, 425-429 (2002).
- 107 Mondal, N. K., Bhattacharya, P. & Ray, M. R. Assessment of DNA damage by comet assay and fast halo assay in buccal epithelial cells of Indian women chronically exposed to biomass smoke. *International journal of hygiene and environmental health* **214**, 311-318 (2011).
- 108 Sisenando, H. A., de Medeiros, S. R., Artaxo, P., Saldiva, P. H. & de Souza Hacon, S. Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC oral health* **12**, 6 (2012).
- 109 Sarto, F., Tomanin, R., Giacomelli, L., Iannini, G. & Cupiraggi, A. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutation Research Letters* **244**, 345-351 (1990).
- 110 Suruda, A. *et al.* Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2**, 453-460 (1993).
- 111 Titenko-Holland, N. *et al.* Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **371**, 237-248 (1996).
- 112 Ying, C. *et al.* Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomedical and environmental sciences: BES* **10**, 451-455

- (1997).
- 113 Burgaz, S. *et al.* Chromosome damage in lymphocytes and in exfoliated buccal and nasal mucosa
cells of welders. *Toxicology Letters* **95**, 43-44 (1998).
- 114 Wultsch, G. *et al.* Formation of micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated nasal and
oral cells: Results of a human study with workers in a power plant processing poultry litter.
International journal of hygiene and environmental health **216**, 82-87 (2013).
- 115 Wultsch, G. *et al.* The sensitivity of biomarkers for genotoxicity and acute cytotoxicity in nasal and
buccal cells of welders. *International journal of hygiene and environmental health* (2013).
- 116 Bruschweiler, E. D. *et al.* Workers exposed to wood dust have an increased micronucleus
frequency in nasal and buccal cells: results from a pilot study. *Mutagenesis* **29**, 201-207,
doi:10.1093/mutage/geu003 (2014).
- 117 Bravo, C. & Leon, C. Frecuencia de alteraciones cromosómicas asociadas con la exposición
crónica al humo de leña como un factor de riesgo de la salud de mujeres expuestas,
pertenecientes a áreas rurales aledañas al municipio de Popayán (Cauca). *Trabajo de grado
(Biólogo) Grupo de Toxicología Genética y Citogenética*, Universidad del Cauca, Popayán
(2008).
- 118 Perafan, J. & Rosero, R. Evaluación del efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en el
epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos mediante el ensayo citoma de
micronúcleos. *Trabajo de grado (Biólogo) Grupo de Toxicología Genética y Citogenética*,
Universidad del Cauca, Popayán (2013).
- 119 Naeher, L. P. *et al.* Critical Review of the Health Effects of Wood Smoke. *Health Canada, Ottawa,
ON* (2005).
- 120 Mastandrea, C. *et al.* Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores
biológicos. (2005).
- 121 Tsai, S. M. *et al.* Characterization of non-methane hydrocarbons emitted from various cookstoves
used in China. *Environmental science & technology* **37**, 2869-2877 (2003).
- 122 Becker, W., Naumann, H. H., Pfalz, C. R., Pastor, J. B. & Martínez, X. S. *Otorrinolaringología:
manual ilustrado* (Mosby/Doyma, 1995).
- 123 Cui, D. *et al.* *Atlas of histology: with functional and clinical correlations*. (Lippincott Williams &
Wilkins Baltimore, 2011).
- 124 Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. (Clarendon Press,
1989).
- 125 Leonard, S. *et al.* Wood smoke particles generate free radicals and cause lipid peroxidation, DNA
damage, NF [kappa] B activation and TNF-[alpha] release in macrophages. *Toxicology* **150**, 147-
157 (2000).
- 126 Danielsen, P. H. *et al.* Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to
wood smoke in healthy humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of
Mutagenesis* **642**, 37-42 (2008).
- 127 IARC. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 98: Painting,
Firefighting, and Shiftwork*. Vol. 98 (Iarc, 2007).
- 128 Fortoul, T. Air Pollution and Its Effects in the Respiratory System. (2011).
- 129 Devlin, T. M. *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. (2004).
- 130 Gelboin, H. V. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation
of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological Reviews* **60**, 1107-1166 (1980).
- 131 Repine, J. E., Bast, A. & Lankhorst, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease.
American journal of respiratory and critical care medicine **156**, 341 (1997).
- 132 Dexheimer, T. S. in *DNA Repair of Cancer Stem Cells* 19-32 (Springer, 2013).
- 133 Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S. & Pfeiffer, P. DNA double-
strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an
alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic acids research* **28**, 2585-2596
(2000).
- 134 Hefferin, M. L. & Tomkinson, A. E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-
homologous end joining. *DNA repair* **4**, 639-648 (2005).
- 135 Grundy, G. J., Moulding, H. A., Caldecott, K. W. & Rulten, S. L. One ring to bring them all—The
role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA repair* **17**, 30-38 (2014).
- 136 Burma, S., Chen, B. P. & Chen, D. J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining

- genomic integrity. *DNA repair* **5**, 1042-1048 (2006).
- 137 Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. & Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an
update. *Toxicology* **193**, 3-34 (2003).
- 138 Cajaraville, M. Concepto de Biomarcador. Utilidad de los biomarcadores celulares en Programas
de Seguimiento Ambiental. *ENVIRONMENTAL QUALITY ASSESMENT* (2003).
- 139 McCarthy, J. F. & Shugart, L. R. *Biomarkers of environmental contamination*. (Lewis Publishers,
1990).
- 140 Bonassi, S., Neri, M. & Puntoni, R. Validation of biomarkers as early predictors of disease.
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **480**, 349-358
(2001).
- 141 Schulte, P. & Talaska, G. Validity criteria for the use of biological markers of exposure to chemical
agents in environmental epidemiology. *Toxicology* **101**, 73-88 (1995).
- 142 Peña, C. E., Carter, D. E. & Ayala, F. Toxicología ambiental: Evaluación de riesgos y restauración
ambiental. (2001).
- 143 Boffetta, P. Biomarkers in cancer epidemiology: An integrative approach. *Carcinogenesis* **31**, 121
(2010).
- 144 Hernández, F. G. The role of biomarkers in human toxicology. (2012).
- 145 Roncancio, C. L. & Clavijo, H. A. Monitoreo genético: utilización de biomarcadores en poblaciones
humanas. *Acta domin* **18**, 108-113 (1996).
- 146 Owen, R., Galloway, T. S., Hagger, J. A., Jones, M. B. & Depledge, M. H. Biomarkers and
environmental risk assessment: Guiding principles from the human health field. *Marine pollution
bulletin* **56**, 613-619 (2008).
- 147 Angelieri, F., Carlin, V., Martins, R. A. & Ribeiro, D. A. Biomonitoring of mutagenicity and
cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *American Journal of Orthodontics
and Dentofacial Orthopedics* **139**, e399-e404 (2011).
- 148 MinSalud. PLAN DECENAL DE SALUD PÚBLICA, PDSP 2012-2021. (2012).
- 149 Colmenares, C. C. & Eslava-Schmalbach, J. SALUD DE LA POBLACIÓN DESDE LA
PERSPECTIVA DE LOS DETERMINANTES SOCIALES EN SALUD. *Revista Salud Bosque!*
Volumen **3**, 75-80 (2013).
- 150 Thomas *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols* **4**, 825-837 (2009).
- 151 Bonassi, S. *et al.* The HUMAN MicroNucleus project on eXfoliated buccal cells (HUMN): The role
of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation
Research/Reviews in Mutation Research* **728**, 88-97 (2011).
- 152 Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P. & Fenech, M. The HUMN XL scoring
criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay -
An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **753**,
100-113 (2013).
- 153 Zalacain, M., Sierrasesumaga, L. & Patino, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic
instability induced by genotoxic agents. *Anales del sistema sanitario de Navarra* **28**, 227-236
(2004).
- 154 Almeida, T. *et al.* Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative
nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. *Cancer genetics
and cytogenetics* **150**, 16-21 (2004).
- 155 Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a. *Mutation
Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **600**, 58-66 (2006).
- 156 Rodrigues, A., Arruda, M. & Garcia, P. Evidence of DNA damage in humans inhabiting a
volcanically active environment: A useful tool for biomonitoring. (2012).
- 157 Arrebola, D. F. A. & Fernández, L. A. R. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos
in vitro. (2003).
- 158 Battershill, J., Burnett, K. & Bull, S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in
peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis* **23**, 423-
437 (2008).
- 159 Wild, C. P., Law, G. R. & Roman, E. Molecular epidemiology and cancer: promising areas for
future research in the post-genomic era. *Mutation Research/Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis* **499**, 3-12 (2002).
- 160 Kirsch, M. & Fenech, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and

- necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* **16**, 51-58 (2001).
- 161 D'Agostini, F. *et al.* Cytogenetic analysis of gingival epithelial cells, as related to smoking habits and occurrence of periodontal disease. *International journal of hygiene and environmental health* **216**, 71-75 (2013).
- 162 Speit, G. & Schmid, O. Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **613**, 1-9 (2006).
- 163 Thomas, Harvey, S., Gruner, T. & Fenech, M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **638**, 37-47 (2008).
- 164 Ramirez, A. & Saldanha, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* **1**, 246-260 (2002).
- 165 Çelik, A., Yildirim, S., Ekinci, S. Y. & Taşdelen, B. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and environmental safety* **92**, 265-270 (2013).
- 166 Hilo, J. *Histología de Di Fiori: Texto y Atlas*. (El Ateneo. Primera edicion. Buenos Aires, 2001).
- 167 Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histology A Text and Atlas*. Sixth Edition edn, (Lippincott Williams & Wilkins, 2011).
- 168 Slack, J. M. W. Stem cells in epithelial tissues. *Science* **287**, 1431 (2000).
- 169 Stevens, A. & Lowe, J. S. *Histologia humana*. Vol. 3 (Elsevier, 2006).
- 170 Cui, D. *Atlas of histology: with functional and clinical correlations*. Firts Edition edn, 439 (2011).
- 171 Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. (Ed. Médica Panamericana, 2007).
- 172 Stevens, A. & Lowe, J. S. *Histología humana*. (Harcourt Brace, 1998).
- 173 Netter, F. H. *Atlas of human anatomy*. (Saunders/Elsevier, 2006).
- 174 Proença, M. *et al.* Immediate and short term effects of smoking on nasal mucociliary clearance in smokers. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)* **17**, 172-176 (2011).
- 175 Harris, D. & Robinson, J. R. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *Journal of pharmaceutical sciences* **81**, 1-10 (1992).
- 176 Thomas, P. *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols* **4**, 825-837 (2009).
- 177 Squier, C. A. & Kremer, M. J. Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs* **2001**, 7-15 (2001).
- 178 Tolbert, P. E., Shy, C. M. & Allen, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **271**, 69-77 (1992).
- 179 Thomas, P. & Fenech, M. in *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo* 235-248 (Springer, 2011).
- 180 Behera, D., Dash, S. & Malik, S. Blood carboxyhaemoglobin levels following acute exposure to smoke of biomass fuel. *The Indian journal of medical research* **88**, 522 (1988).
- 181 Alzate, M. C. *La estratificación socioeconómica para el cobro de los servicios públicos domiciliarios en Colombia: ¿Solidaridad o focalización?*, (CEPAL, 2006).
- 182 Bruce, N. *et al.* Impact of improved stoves, house construction and child location on levels of indoor air pollution exposure in young Guatemalan children. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* **14**, S26-S33 (2004).
- 183 Fenech, M. & Bonassi, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* **26**, 43-49 (2011).
- 184 Bonassi, S. *et al.* State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis* **24**, 295-302 (2009).
- 185 Burgaz, S. *et al.* Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **521**, 47-56 (2002).
- 186 Tolbert, P., Shy, C. & Allen, J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *American journal of epidemiology* **134**, 840 (1991).
- 187 Fenech, M. A lifetime passion for micronucleus cytome assays—reflections from Down Under.

- Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **681**, 111-117 (2009).
- 188 El-Setouhy, M. *et al.* Genotoxic effects of waterpipe smoking on the buccal mucosa cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **655**, 36-40 (2008).
- 189 Gadhia, P. K., Thumbar, R. P. & Kevadiya, B. Cytome Assay of Buccal Epithelium for Bio-monitoring Genotoxic Assessment of Benzene Exposure among Petrol Pump Attendants. *Int J Hum Genet* **10**, 239-245 (2010).
- 190 Speit, G. *et al.* Analysis of micronuclei, histopathological changes and cell proliferation in nasal epithelium cells of rats after exposure to formaldehyde by inhalation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **721**, 127-135 (2011).
- 191 McDougall, C. M. *et al.* Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **39**, 560 (2008).
- 192 Martins, R. A., da Silva Gomes, G. A., Aguiar Jr, O. & Ribeiro, D. A. Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environment international* **35**, 1062-1065 (2009).
- 193 Karahalil, B., Karakaya, A. E. & Burgaz, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **442**, 29-35 (1999).
- 194 Carlin, V. *et al.* Biomonitoring of DNA damage and cytotoxicity in individuals exposed to cone beam computed tomography. (2014).
- 195 Mendonça, P. & Ladeira, C. Evaluation of staining techniques on the results of micronucleus in exfoliated oral mucosa cells. (2011).
- 196 Sarto, F. *et al.* The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* **2**, 11-17 (1987).
- 197 Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R. & Knasmüller, S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **15**, 1835 (2006).
- 198 Kausar, A., Giri, S., Roy, P. & Giri, A. Changes in buccal micronucleus cytome parameters associated with smokeless tobacco and pesticide exposure among female tea garden workers of Assam, India. *International journal of hygiene and environmental health* **217**, 169-175 (2014).
- 199 Sharma, R., Singh, S. & Gandhi, G. GENETIC INJURY STUDIES IN JUDO PLAYERS. (2012).
- 200 Carnesoltas-Lázaro, D., Domínguez-Odio, A., Frías-Vázquez, A., Dutok-Sánchez, C. & García-Heredia, G. Alteraciones citogenéticas bucoepiteliales en pacientes portadores de leucoplasia. *Rev Mex Patol Clin* **54**, 104-111 (2007).
- 201 Ünal, M. *et al.* Cytogenetic biomonitoring in children with chronic tonsillitis: micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelium cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* **69**, 1483-1488 (2005).
- 202 Ray, M., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S. & Lahiri, T. Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *International Journal of Human Genetics* **5**, 45 (2005).
- 203 Roychoudhury, S. *et al.* Activation of protein kinase B (PKB/Akt) and risk of lung cancer among rural women in India who cook with biomass fuel. *Toxicology and Applied Pharmacology* **259**, 45-53, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.002> (2012).
- 204 Forsberg, B. *et al.* Comparative health impact assessment of local and regional particulate air pollutants in Scandinavia. *Ambio*, 11-19 (2005).
- 205 Bonassi, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* **28**, 625 (2006).
- 206 Nersesyan, A., Muradyan, R., Kundi, M. & Knasmueller, S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis* **26**, 295-301 (2011).
- 207 Shi, Q. & King, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* **437**, 1038-1042 (2005).
- 208 Ferreira, F., Pra, D., Martino-Roth, M. & Garcias, G. Buccal micronucleus frequency is associated with age in Down syndrome. *Genet. Mol. Res* **8**, 1231-1237 (2009).
- 209 Cerqueira, E. *et al.* Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **562**, 111-117 (2004).

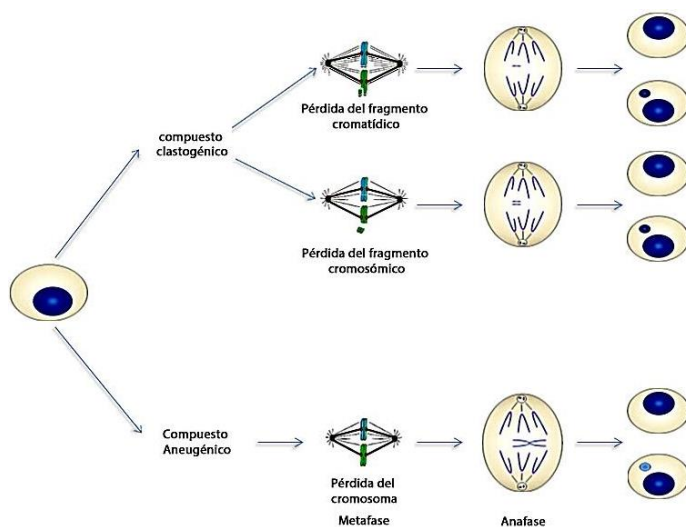
- 210 Goff Jr, D. C. *et al.* Risk Assessment Work Group. (2010).
- 211 Treminio, R. & Wambeke, J. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA). Dinámica institucional y desafíos. *Documento de trabajo, Santiago de Chile, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe* (2006).
- 212 Joshi, M. *et al.* Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of Oral Biology* **56**, 63-67 (2010).
- 213 Benedetti, D. *et al.* Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **752**, 28-33 (2013).
- 214 Cerqueira, E. *et al.* Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. (2014).
- 215 Turner, M. D. & Ship, J. A. Dry mouth and its effects on the oral health of elderly people. *J Am Dent Assoc* **138**, 15S-20S (2007).
- 216 Öztürk, S. *et al.* Acute wood or coal exposure with carbon monoxide intoxication induces sister chromatid exchange. *Clinical Toxicology* **40**, 115-120 (2002).
- 217 Behera, D. & Jindal, S. K. Respiratory symptoms in Indian women using domestic cooking fuels. *CHEST Journal* **100**, 385-388 (1991).
- 218 Shukla, J. Social Determinants of Urban Indian Women's Health Status. (2011).
- 219 Coonrod, C. S. Chronic hunger and the status of women in India. *The Hunger Project, New York* <http://www.thp.org> (1998).
- 220 Tortajada, J. *et al.* Prevención pediátrica del cáncer: factores dietéticos. *Rev Esp Pediatr [serie en Internet]* **58**, 406-422 (2002).
- 221 OMS. Nuevos datos de los países muestran la pesada carga de la contaminación del aire en espacios cerrados. *Centro de prensa* (2007).
- 222 Danielsen, P. H. *et al.* Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chemical research in toxicology* **24**, 168-184 (2011).
- 223 Gentric, G. & Desdouets, C. Polyploidization in Liver Tissue. *The American Journal of Pathology* **184**, 322-331 (2014).
- 224 Chávez Delgado, M. J. Aplicación de técnicas de citogenética molecular para la detección de aneuploidía y clastogenicidad en células humanas expuestas a arsénico. (2006).
- 225 Postlethwaite, A. E., Jackson, B. K., Beachey, E. H. & Kang, A. H. Formation of multinucleated giant cells from human monocyte precursors. Mediation by a soluble protein from antigen-and mitogen-stimulated lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **155**, 168-178 (1982).
- 226 Oliveri, R. & Thierer, J. *Insuficiência cardíaca*. (Ed. Médica Panamericana, 1999).
- 227 Horbul, J. E., Schmechel, S. C., Miller, B. R., Rice, S. A. & Southern, P. J. Herpes simplex virus-induced epithelial damage and susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in human cervical organ culture. *PloS one* **6**, e22638 (2011).
- 228 Ehya, H. Diagnostic Difficulties in Pulmonary Cytology and Proper Use of Ancillary Tests. (2012).
- 229 Bhattathiri, V. Amitotic cell divisions and tumour growth: an alternative model for cell kinetic compartments in solid tumours. *Oral Oncology* **37**, 288-295 (2001).
- 230 Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. Vol. 3 (Oxford university press Oxford, 1999).
- 231 Hib, J. (Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003).
- 232 Shetty, S. & Gokul, S. Keratinization and its disorders. *Oman medical journal* **27**, 348 (2012).
- 233 Mathison, B. H., Harman, A. E. & Bogdanffy, M. S. DNA damage in the nasal passageway: a literature review. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **380**, 77-96 (1997).
- 234 Çinar, F. & Beder, L. Nasal mucociliary clearance in coal mine workers. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* **130**, 767-769 (2004).
- 235 Vetter, A., Augustijns, P. & Bernkop-Schnürch, A. Solubilizing agents in nasal formulations and their effect on ciliary beat frequency. *Toxicology in Vitro* **26**, 150-156 (2012).
- 236 Stanley, P., Wilson, R., Greenstone, M., MacWilliam, L. & Cole, P. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax* **41**, 519-523 (1986).
- 237 Werner, U. & Kissel, T. Development of a human nasal epithelial cell culture model and its suitability for transport and metabolism studies under in vitro conditions. *Pharmaceutical research*

- 12, 565-571 (1995).
- 238 Lee, M.-K. *et al.* Air-liquid interface culture of serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies. *Drug delivery* **12**, 305-311 (2005).
- 239 Krishnamoorthy, R. & Mitra, A. K. Prodrugs for nasal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **29**, 135-146 (1998).
- 240 Kissel, T. & Werner, U. Nasal delivery of peptides: an in vitro cell culture model for the investigation of transport and metabolism in human nasal epithelium. *Journal of controlled release* **53**, 195-203 (1998).
- 241 Richard, F. *et al.* Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. *Mutation Research/DNAging* **295**, 71-80 (1993).
- 242 Jacobs, P. A., Court, B. W. & DOLL, R. Distribution of human chromosome counts in relation to age. *Nature* **191**, 1178 (1961).
- 243 Bolognesi, C. *et al.* Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **6**, 249-256 (1997).
- 244 Bonassi, S. *et al.* HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and molecular mutagenesis* **37**, 31-45 (2001).
- 245 Fenech, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes--a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **404**, 155-165 (1998).
- 246 Catalan, J. *et al.* Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenetic and Genome Research* **68**, 11-16 (1995).
- 247 Konopacka, M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma* **50**, 380-382 (2002).
- 248 Suhas, S., Ganapathy, K. & Ramesh, C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **561**, 15-21 (2004).
- 249 GOUKASSIAN, D. *et al.* Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *The FASEB journal* **14**, 1325-1334 (2000).
- 250 Pardo, M. Citoquinesis en células eucariotas. *Investigación y ciencia*, 40-49 (2005).
- 251 Wyllie, A. in *Cell death in biology and pathology* 9-34 (Springer, 1981).
- 252 Titenko-Holland, N., Moore, L. E. & Smith, M. T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **312**, 39-50 (1994).
- 253 Jin, Y. *et al.* Geographical, spatial, and temporal distributions of multiple indoor air pollutants in four Chinese provinces. *Environmental science & technology* **39**, 9431-9439 (2005).
- 254 Sjögren, M., Ehrenberg, L. & Rannug, U. Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **358**, 97-112 (1996).
- 255 Mejía Barragán, F. *Implicaciones ambientales del uso de leña como combustible doméstico en la zona rural de Usme/Environmental implications of the use of wood as domestic fuel in the rural area of Usme*, Universidad Nacional de Colombia, (2011).
- 256 Network, B. U. Manuales sobre energía renovable: Biomasa. *Fortalecimiento de la capacidad en energía renovable para América central*, 56 (2002).
- 257 Lora Mir, D. Diseño, fabricación y evaluación de la eficiencia de una estufa ahorradora de leña en Arreguy, Haití. *Universidad Para la Cooperación Internacional* (2011).
- 258 Velásquez, A. & Zavala, R. Impacto de las cocinas mejoradas de combustión de biomasa en la salud de niños de áreas de escasos recursos. Revisión Sistemática.
- 259 Akunne, A. F., Louis, V. R., Sanon, M. & Sauerborn, R. Biomass solid fuel and acute respiratory infections: the ventilation factor. *International journal of hygiene and environmental health* **209**, 445-450 (2006).
- 260 Finaud, J. *et al.* Competition and food restriction effects on oxidative stress in judo. *International journal of sports medicine* **27**, 834-841 (2006).

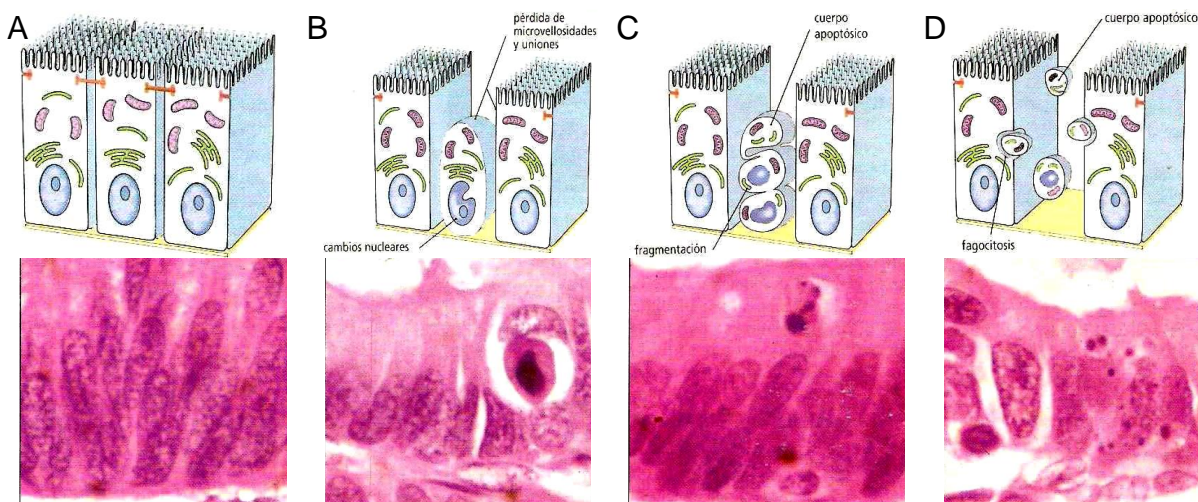
- 261 Packer, L., Cadenas, E. & Davies, K. J. Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 123-125 (2008).
- 262 Berzosa, C. *et al.* Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *BioMed Research International* **2011** (2011).
- 263 Khansari, N., Shakiba, Y. & Mahmoudi, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery* **3**, 73-80 (2009).
- 264 Grotto, D. *et al.* Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. *Ecotoxicology and environmental safety* **74**, 487-493 (2011).
- 265 Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I. & Medina, I. Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 3334-3340 (2008).
- 266 Chatterjee, M., Janarthan, M., Manivannan, R., Rana, A. & Chatterjee, M. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Chemico-biological interactions* **188**, 102-110 (2010).
- 267 Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S. & Appel, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *circulation* **106**, 2747-2757 (2002).
- 268 Carvalho, I. M. *et al.* Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. *Chemosphere* **82**, 1056-1061 (2011).
- 269 Diler, S. B. & Ergene, S. Nuclear anomalies in the buccal cells of calcite factory workers. *Genetics and molecular biology* **33**, 374-378 (2010).
- 270 Rivillas, J. C., Ivo, J., Montaña Caicedo, C. M. & Cuéllar Segura, M. L. Registros, observatorios y sistemas de seguimiento en salud en Colombia: Orientación de políticas basadas en la evidencia y gestión del conocimiento. *Monitor Estratégico*, 56 (2013).
- 271 Uribe, A. G. *et al.* Registros, Observatorios, Sistemas de Seguimiento y Salas Situacionales Nacionales Sistema de Monitoreo y Evaluación al Plan Decenal de Salud Pública PDSP Colombia 2012 - 2021. *República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social* (2013).
- 272 Glück, U., Schütz, R. & Gebbers, J.-O. Cytopathology of the nasal mucosa in chronic exposure to diesel engine emission: a five-year survey of Swiss customs officers. *Environmental Health Perspectives* **111**, 925 (2003).
- 273 Kirsch-Volders, M. *et al.* The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of toxicology* **85**, 873-899 (2011).

ANEXOS

Anexo 1. Origen de los MN a partir de cromosomas enteros y fragmentos acéntricos de cromosomas en una célula en división. Modificado de Fenech *et al.* (1999) y Zalacain *et al.* (2004).^{50,153}



Anexo 2. Proceso apoptótico de las células columnares ciliadas del epitelio respiratorio nasal pseudoestratificado. **A)** Células columnares normales estrechamente yuxtapuestas, adheridas por uniones celulares. **B)** Primer pasó de la apoptosis en el cual las células pierden sus cilios y uniones superficiales reduciendo su tamaño. Los cromosomas son fragmentados a nucleosomas individuales por las endonucleasas. **C)** Se da una disgregación del citoplasma y del núcleo en fragmentos conocidos como cuerpos apoptóticos. **D)** Los fragmentos apoptóticos son fagocitados por las células adyacentes y las células fagocíticas. Tomado de Stevens & Lowe (2006).¹⁷²



Anexo 3. Encuesta realizada a la población de estudio.

EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE BIOMASA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE LOS EPITELIOS BUCAL Y NASAL, EN UN GRUPO DE MUJERES EXPUESTAS PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, (CAUCA)

Lugar	Fecha	Día	Mes	Año	Código	Encuestador
-------	-------	-----	-----	-----	--------	-------------

Favor responder a las siguientes preguntas en forma sincera, clara y concreta. En caso de no entender las preguntas, puede decirlo para dar una explicación adicional

1. INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA

Nombre completo				Fecha de nacimiento				Lugar			
Edad (años)				Oficio actual							
Vereda/barrio				Empresa							
Dirección casa				Dirección empresa							
Celular y/o fijo				Teléfono empresa							
Nivel de educación	Primaria	Secundaria	Universidad	Estado civil	Soltera	Casada	U. Libre	Viuda			
Estrato socioeconómico	1	2	3	Hijos	No	Si	N°				

2. INFORMACIÓN DEL GRUPO EXPUESTO

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN E INFRAESTRUCTURA DE LA COCINA

Expuesta a humo de	No	Si								
Material de combustible	Leña	Desechos Agrícolas	Estiércol	Carbón mineral	Carbón					
Nombre o tipo de leña										
¿Por qué?										
Frecuencia de la posición	Años de exposición			Días a la semana/mes			Horas por día			
Ubicación de la cocina	Exterior	Interior								
Ventilación de la cocina	Adecuada	Moderada	Escasa							
Tipo de estufa	Cámara de combustión abierta			Cámara de combustión semicerrada			Cámara de combustión con chimenea			
Expuesta a plaguicidas	No	Insecticida	Fungicida	Herbicida	Rodenticida	Acaricida	Bactericid			
Frecuencia de la exposición	Horas por día			Días a la semana/mes			Hace cuanto			
Para expuestas	Horas por día		Días a la semana/mes		Hace cuanto lo dejó		Cuanto			

2.2 ESTILO DE VIDA

Actividad física (caminar) (d/s)	0	1	2	3	4	>4	Cuántos?	Esporádico		
¿Cuántas horas al día?	1		2		3		>3			
¿En qué momento?	Amanecer		Mañana	Mediodía	Tarde	Atardecer	Noche			
¿Cuántas horas labora al día?	0		4		8		10		12	>12

3. INFORMACIÓN PARA EL GRUPO EXPUESTO Y EL GRUPO REFERENTE

3.1 ANTECEDENTES FAMILIARES

Enfermedad	Usted	Familiar	Enfermedad	Usted	Familiar
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)			Cáncer: Pulmones, bronquios, orofaringe, tracto nasofaríngeo y de laringe, mandíbula y lengua		
Enfermedades respiratorias crónicas en vías aéreas inferiores			Infecciones respiratorias agudas en vías respiratorias inferiores		
Bronquitis crónica			Cataratas		
Enfermedad pulmonar intersticial			Insuficiencia ponderal al nacer		
Enfisema			Mortalidad perinatal y de lactantes		
Tuberculosis			Mortalidad de lactantes		
Asma			Cardiopatía isquémica		

3.2 AFECCIONES RESPIRATORIAS

Afecciones respiratorias	Si	No	¿Cuáles?	Con	qué
Observaciones					
Examen a nivel respiratorio	Si	No	¿Cuáles?		
	Hace cuánto		Cuánto tiempo		
Irritación nasal	Resequedad nasal		Dolor o dificultad para respirar		Ardor en la garganta
Obstrucción nasal	Rinitis		Espujo		Tos seca
Hemorragia nasal (Epistaxis)	Sinusitis		Jadea		Sequedad en la boca

4. INFORMACIÓN SOBRE DIETA

Medidas antropométricas	Estatura		Peso		IMC	
¿Cuántas comidas consume al día?	1	2	3	4	5	>5
¿Qué tipo de alimentos consume en	Harinas	Frutas	Verduras	Lácteos	Carnes	Grasas
¿A qué horas son sus comidas?	Desayuno	Entre día	Almuerzo	Entre tarde	Comida	

Alimentos	Cuántas porciones al día en sus comidas (n/d)	Cuántas veces a la semana?	Cómo (tipo de preparación)					
			Frito (F)	Asado(A)	Ahumado	Cosido (C)	Vapor (V)	Crudo (Cr)
Harinas (almidón)	Arroz blanco	Yuca	Pastas	Guineo	Otras ¿Cuáles?			
	Masitas	Papa	Plátano	Pan blanco				
Cereales (fibra)	Avena	Cebada	Arroz integral	Centeno	Sorgo			
	Cereal	Linaza	Pan integral	Arepa	Maíz			
	Mazamorra	Colada						
Oleaginosas	Soya	Nueces	Maní	Ajonjolí	Coco			
Frutas	Piña	Mandarina	Banano	Mango	Otras ¿Cuáles?			
	Papaya	Granadilla	Naranja	Guama	Manzana			
	Pera	Uva	Limón	Mora	Guayaba			
	Lulo	Maracuyá	Fresa	Zapote	Mamoncillo			
	Chontaduro	Ciruela	Guanábana	Durazno	Pasas			
Verduras/ hortalizas	Apio	Coliflor	Tomate	Cebolla	Rábano			
	Pepino	Remolacha	Col	Lechuga	Berenjena			
	Brócoli	Ajo	Zanahoria	Pimentón	Acelga			
	Zapallo	Repollo	Espinaca	Otras ¿Cuáles?				
Lácteos	Leche	Queso	Kumis	Yogurt	Postres			
	Jugos en L.	Crema de L.	Manjar blanco	Cortado	Otras ¿Cuáles?			
Carnes	Res	Pollo	Cerdo	Cui	Pescado			
	Atún	Cordero	Pavo	Vísceras	Mariscos			
Grasas	Aceite	Manteca	Mantequilla	Margarina	Salsas			
	Cuero cerdo	Cuero pollo	Aguate	Otras ¿Cuáles?				
Legumbres	Alverja	Lenteja	Garbanzo	Frijol	Ulluco			
	Abas	Otras ¿Cuáles?						
Bebidas	Café	Aromáticas	Jugos en agua	Jugos en leche	Chocolate			
	Agua de panela	Limonada	Refrescos	Gaseosas	Te			
Sal	Nada	Poco	Medio	Mucho				
Comidas. R	¿Cuáles?							
Mecato	¿Cuáles?							
Azúcar (cd)								
Huevo								

María Mercedes Ramírez de Valdenebro
Elizabeth Cristina Ordóñez Paz

Anexo 4. Consentimiento Informado.

MONITOREO BIOLÓGICO EN MUJERES EXPUESTAS A HUMO DE LEÑA DE DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

La estudiantes María Mercedes Ramírez de Valdenebro con cédula de ciudadanía 34'328.803 y Elizabeth Cristina Ordóñez Paz con cédula de ciudadanía 1.061'725.987 del programa de Biología con énfasis en Toxicología Genética Y Citogenética de la Universidad del Cauca, realizarán el estudio **“EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE BIOMASA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE LOS EPITELIOS BUCAL Y NASAL, EN UN GRUPO DE MUJERES EXPUESTAS PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, CAUCA”** Dirigido por la docente Nohelia Cajas Salazar.

PROPÓSITO: El propósito es identificar biomarcadores potenciales para la detección temprana de células pre-neoplásicas de los epitelios bucal y nasal en poblaciones expuestas ambientalmente a agentes genotóxicos y carcinogénicos. Además se busca determinar los daños citotóxicos y genotóxicos mediante la estimación cuantitativa de la frecuencia de biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en el epitelio nasal y de genotoxicidad, citotoxicidad y de muerte celular en el epitelio bucal.

JUSTIFICACIÓN: La evaluación de la exposición al humo de leña es pertinente ya que diferentes estudios han concluido que la exposición a los compuestos emitidos durante la pirolisis de la madera tiene un gran impacto sobre la salud de las personas, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes enfermedades respiratorias y diversos tipos de cánceres. Actualmente, se han desarrollado pocas estrategias de prevención que permitan detectar estadios tempranos de enfermedades relacionadas a este factor de riesgo, por lo cual este trabajo podría dar una pauta para que agencias gubernamentales creen estrategias de prevención y promoción para la comunidad afectada. Con el fin de conocer el efecto de la exposición sobre las mujeres expuestas, se identificará el efecto citotóxico y genotóxico de la exposición al humo de leña en células del epitelio de la mucosa oral y en células del epitelio respiratorio nasal, los cuales son biomarcadores potenciales para la detección temprana de futuras enfermedades respiratorias. Para lograr este propósito se empleará el Ensayo de Micronúcleos Citómico en una población de mujeres expuestas ambientalmente al humo de leña.

METODOLOGÍA: En este estudio serán seleccionadas 70 mujeres expuestas al humo de leña pertenecientes a zonas rurales de tres veredas del municipio de Popayán y dos del municipio de Timbío del departamento del Cauca, y 70 mujeres no expuestas como grupo referente. Para incentivar la participación de los individuos, se han realizado charlas motivacionales explicándoles la problemática en torno a la exposición y la importancia de esta investigación para la comunidad científica y la población de estudio. Igualmente a las mujeres se les informó los posibles riesgos de la toma de la muestra, aclarándoles en qué consistía su participación y la importancia de esta. A las mujeres que acepten participar en el estudio se les aplicará un cuestionario de aproximadamente 10 minutos con el fin de conocer características demográficas y otras relacionadas a la exposición. Para la toma de la muestra, se les indicará a las mujeres presentarse sin ninguna afección respiratoria de origen viral. Bajo medidas de asepsia y con la ayuda de un espéculo nasal, se introducirá un cepillo citológico nuevo y estéril en cada una de las cavidades nasales y de las mejillas de las mujeres y se realizará un frotis. Este procedimiento no implica cortes, punción del epitelio ni toma de biopsias. Finalizada la toma de la muestra, esta se depositará en un recipiente nuevo y estéril, luego será almacenado en una nevera portátil a una temperatura de 4°C para su posterior traslado al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, para el procesamiento, observación y análisis. Debido a la complejidad y al tiempo requerido para la toma de las muestras y su procesamiento se muestrearán máximo cinco (5) mujeres día cada.

El procedimiento de muestro, procesamiento y observación de las células columnares del epitelio respiratorio nasal, no se explicará detalladamente ya que este protocolo estandarizado por las Biólogas María Mercedes Ramírez de Valdenebro y Elizabeth Cristina Ordoñez Paz, se encuentra siendo evaluado por la oficina División de Articulación Con el Entorno de la Universidad del Cauca, con el fin de conocer si esta tecnología debe ser protegida para efectos de comercialización, según lo establecido en la legislación vigente en el país, el estatuto sobre propiedad intelectual expedido en el Acuerdo 008 del 22 de febrero de 1999 del Consejo Superior de la Universidad del Cauca, y las normas que lo modifiquen y el artículo 31 de la Ley 1450 de 2011, "Artículo 31 DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN FINANCIADOS CON RECURSOS DEL PRESUPUESTO NACIONAL"

La Universidad del Cauca se compromete a vigilar que las muestras del epitelio nasal sean tomadas en un contenedor apropiado para tal fin de forma aséptica para evitar complicaciones. Las muestras del epitelio nasal sólo serán usadas para los propósitos de esta investigación y no podrán usarse para nuevas investigaciones.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO PARA LA COMUNIDAD: Esta investigación tiene relevancia social y científica y obedece a una problemática de salud pública. El estudio se desarrollará como una estrategia en la búsqueda de mecanismos que disminuyan el impacto en la salud producido por la exposición crónica al humo de leña. El beneficio para el participante consistirá en atender a talleres y charlas de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por esta exposición y, a la reflexión y motivación hacia el cambio de actitud para la prevención de riesgos a la salud por exposición a este. Durante las capacitaciones las mujeres participantes tendrán el beneficio de conocer los resultados grupales del estudio.

TIPO DE INFORMACIÓN QUE SE PRETENDE RECOGER CON EL ESTUDIO: Se pretende recolectar mediante una encuesta, información de la población de estudio como las condiciones de vida y salud y estilo de vida de los individuos; como también las características de la exposición en relación a las condiciones de vida. Esta información recolectada permitirá conocer si son variables que modulan el efecto de la exposición a compuestos del humo de leña en la genotoxicidad y citotoxicidad de células exfoliadas bucales y nasales.

RIESGOS ASOCIADOS AL ESTUDIO: La toma de las muestras de los epitelios no incluyen riesgos potenciales y serán tomadas por las investigadoras del presente estudio quienes están capacitadas para tal fin. La toma de la muestra se hará mediante procedimientos que eviten sufrimiento o daño innecesario físico o mental de los individuos. Se utilizarán instrumentos limpios y estériles que aseguren las precauciones adecuadas y que permitan proteger a los sujetos de cualquier posible lesión.

TRATAMIENTO DE LOS DATOS: Los resultados y la información del estudio serán tratados de forma confidencial y para efectos de publicación los resultados se presentarán en forma anónima. Para garantizar la confidencialidad de la información suministrada, los resultados de la prueba serán codificados y se darán a conocer en forma grupal en un seminario, con el propósito de hacer una autorreflexión. El nombre del participante no será vinculado con los resultados del estudio, las investigadoras a cargo del proyecto no estarán en la posibilidad de informar a ninguna otra persona sobre los resultados de las pruebas. Los datos obtenidos en este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se den a conocer los nombres de los participantes. Los resultados de esta investigación no podrán ser usados para ningún tipo de discriminación social, étnica, cultural, política, económica, religiosa, laboral, etc.

RESPONSABILIDAD DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO: El participante, en pleno uso de sus facultades mentales, libre y consciente, está de acuerdo en participar en este estudio y entiende que éste requiere de lo siguiente: Contestar un cuestionario de aproximadamente 10 minutos, para suministrar información personal referente a la edad, estado de salud y estilo de vida. Si es seleccionado para el estudio debe donar una muestra de células de los epitelios nasal y bucal.

AUTONOMÍA Y CORRESPONSABILIDAD DE LOS PARTICIPANTES: El participante es completamente voluntario y puede rehusarse a responder cualquier pregunta si así lo desea o puede tomar libremente la decisión de finalizar la participación en este monitoreo en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal. Se tiene claro que no se proveerá con ninguna compensación económica. Puede preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante o después del estudio a las Investigadoras a cargo del proyecto, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca en la carrera 2º No. 1ª 25 Barrio Caldas, Popayán, en los teléfonos 8209800 Ext. 2643. La firma del documento del Consentimiento Informado es requerida para todas las personas participantes en un estudio de monitoreo biológico. Los procedimientos experimentales en este estudio han sido explicados en un lenguaje claro que el participante ha podido entender. La persona será informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento sin exponerse a represalias (Mundial 1964), y puede ejercer su libertad de escoger sin la intervención de cualquier elemento de fuerza, engaño, coacción o algún otro factor coercitivo o coactivo (Núremberg 1947, Biomédica 1979).

COMPROMISOS EN MATERIA DE DIVULGACIÓN, CRÉDITOS Y COAUTORÍA EN PUBLICACIONES: Los investigadores se comprometen a la divulgación de los resultados a la comunidad de estudio de manera grupal y de forma clara y sencilla para su adecuado entendimiento, así como la divulgación a la comunidad científica por medio de publicaciones y participaciones en eventos científicos (Congresos y seminarios). En el evento en que se llegaran a generar derechos de propiedad intelectual sobre los resultados que se obtengan o se pudieran obtener en el desarrollo del proyecto derivados del proceso de la presente convocatoria, la titularidad sobre los derechos se registrará por lo establecido en el artículo 31 de la Ley 1450 de 2011, "Artículo 31 DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN FINANCIADOS CON RECURSOS DEL PRESUPUESTO NACIONAL.

MANEJO DE MATERIAL VISUAL Y AUDIOVISUAL PRODUCIDO EN EL MARCO DEL ESTUDIO: El material fotográfico obtenido de la zona de estudio y de las mujeres participantes solo será empleando para el desarrollo del proyecto por los investigadores a cargo de él y se manejaran de forma confidencial; igualmente podrá ser empleado para el desarrollo de las charlas dirigidas a la comunidad de estudio y en eventos científicos contando con el previo permiso de la comunidad.

He leído este consentimiento, he entendido en qué consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico "**EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE BIOMASA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE LOS EPITELIOS BUCAL Y NASAL, EN UN GRUPO DE MUJERES EXPUESTAS PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, CAUCA**".


Nombre del Participante


Firma del participante

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Anexo 5. Registro del proyecto ante la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca.

 Universidad del Cauca	Acta de reunión
--	------------------------

 Universidad del Cauca	Acta de reunión
--	------------------------

Ciudad	Popayán			Dependencia(s) responsable (s) de la reunión		Vicerrectoría de Investigaciones	
Fecha	13	12	2011	Hora Inicio	Hora Finalización	Lugar de desarrollo	ACTA No
	Día	Me	Año	9:25 A.M.	11: 00 A. M.	Vicerrectoría de Investigaciones	6. 1.38/42

ORDEN DEL DÍA

1. Verificación de asistencia y aprobación del orden del día
2. Aprobación acta No 41 del 6 de diciembre de 2011
3. Comunicaciones
 - 3.1. Informe final proyecto ID 3309
 - 3.2. Solicitud registro proyecto de grado "Evaluación citotóxica y genotóxica de la exposición crónica del humo de biomasa mediante la prueba de micronúcleos en células de epitelios bucal y nasal en el grupo de mujeres expuestas pertenecientes a zonas rurales aledañas al municipio de Popayán-Cauca" del grupo Toxicología Genética y Citogenética.
 - 3.3. Solicitud registro proyecto de grado "Concordancia entre la decisión clínica de extubación con la medición del tren de cuatro en pacientes bajo efectos de relajantes musculares en salas de cirugía del hospital universitario San José de Popayán octubre 2011 a marzo de 2013" del grupo GRIAN.
 - 3.4. Informe evaluación proyecto ID 2588
4. Reunión con el profesor Mario Armando Valencia para discutir la solicitud de aval para registro del proyecto "Investigación-creación estética crítica con enfoque intercultural".
5. Varios
 - 5.1. Informe sobre convocatorias V y VII de apoyo a proyectos.

DESARROLLO

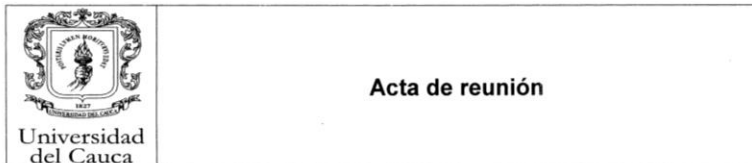
1. Se aprueba el acta No 41 del 6 de diciembre con las observaciones recibidas hasta el 16 de diciembre de 2011 y se excusa el profesor Deibar René Hurtado Ph.D. por encontrarse fuera del país.

Formato ME-GE-2.2-FOR-6

2. Comunicaciones

- 2.1. Se informa el recibo del informe final del proyecto ID 3309 y se lee comunicación aclaratoria del profesor Gustavo Ramírez con respecto a la financiación de un libro como producto final de éste. El Consejo de Investigaciones advierte que se cumple con todos los compromisos y acuerda enviar el informe para evaluación de uno de sus miembros.
- 2.2. Se autoriza el registro del proyecto de pregrado del grupo Toxicología Genética y Citogenética, previas recomendaciones del Comité de Ética para la Investigación Científica, titulado "Evaluación citotóxica y genotóxica de la exposición crónica al humo de biomasa mediante la prueba de micronúcleos en células de los epitelios bucal y nasal, en un grupo de mujeres expuestas pertenecientes a zonas rurales aledañas al municipio de Popayán. Cauca", de las estudiantes Elizabeth Cristina Ordóñez Paz y María Mercedes Ramírez de Valdenebro, del programa de Biología, bajo la dirección de la profesora Nohelia Cajas Salazar y en el marco de la línea de investigación Toxicología genética y Citogenética. Epidemiología molecular- monitoreo biológico, del grupo de Toxicología Genética y Citogenética.
- 2.3. Se autoriza el registro del proyecto de grado del grupo GRIAN, previo aval del Comité de Ética para la Investigación Científica titulado "Concordancia entre la decisión clínica de extubación con la medición del tren de cuatro en pacientes bajo efectos de relajantes musculares en salas de cirugía del hospital universitario San José de Popayán octubre 2011 a marzo de 2013", del residente de la especialización en Anestesiología Diego Andrés Rojas Tejada, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Caicedo y en el marco de la línea de investigación Complicaciones post anestésicas. El Consejo de Investigaciones recomienda que en adelante se solicite una carta donde el estudiante acepta que el proyecto esté registrado como producto del grupo de investigación, en razón al derecho de petición presentado a la facultad de ingeniería civil e informado en la sesión anterior.
- 2.4. Se lee la evaluación del informe final del proyecto ID 2588 "Implementación del campo curricular en la tradición educativa colombiana". Se acuerda una comunicación indicándoles que queda pendiente el compromiso de la escritura del libro, por lo tanto una vez se produzca haga llegar el correspondiente soporte para su registro en el sistema de información de la VRI y archivo.
3. Se adelanta la reunión con el profesor Mario Armando Valencia para discutir la solicitud de aval para registro del proyecto "Investigación-creación estética crítica con enfoque intercultural", indicándole que la intención es retroalimentar al

Formato ME-GE-2.2-FOR-6



Acta de reunión

investigador con algunas observaciones advertidas en la sesión anterior, cuando se discutió el tema.

Al término de la reunión el docente se compromete a enviar el formato VRI con los ajustes discutidos y el Consejo de Investigaciones autoriza su registro en el sistema de información.

El profesor Valencia, presenta adicionalmente un oficio solicitando el cambio de nombre del Grupo Orgánico de Trabajo Estético Relacional y del Acontecimiento (GOTERA) por el de Estética y Crítica, el cual continuará con las líneas de investigación y la naturaleza misma de su creación.

El Consejo de Investigaciones autoriza su registro en el sistema de información de la VRI:

4. Varios

El Vicerrector de Investigaciones, Magister Eduardo Rojas Pineda informa el estado del proceso de las convocatorias internas:

VII convocatoria: 45 proyectos de los cuales 18 proyectos tienen dos pares confirmados, 23 proyectos tienen un solo par confirmado y 4 proyectos no tienen par confirmado.

V Convocatoria MSc y Doctorados: 15 proyectos de los cuales 6 proyectos tienen dos pares confirmados, 6 proyectos tienen un par confirmado y 3 no tienen ningún par confirmado.

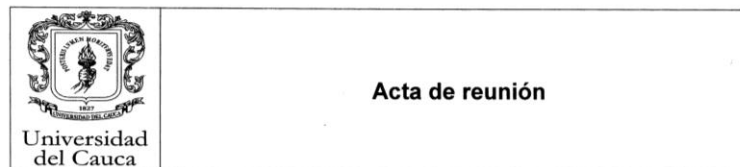
Se informa que las dificultades con la consecución de los pares evaluadores radica en que muchos manifiestan no tener tiempo por la finalización del semestre en sus universidades y otros no se comprometen a entregarla en diciembre.

En consideración al informe, el Consejo de investigaciones aprueba una adenda aplazando en el cronograma final hasta el 17 de febrero de 2012 para la publicación de resultados, previendo que el 30 de enero se cuente con la totalidad de las evaluaciones de los pares académicos. (Ver Anexo)

El Vicerrector de Investigaciones, Mag. Eduardo Rojas informa la aprobación de la reforma al Sistema de Investigaciones mediante Acuerdo 047 de 2011 del Consejo Superior, quedando la Vicerrectoría de Investigaciones con dos divisiones: Gestión de la Investigación y Articulación con el Entorno, se crean los Comités de Área en reemplazo de los Comités de Investigaciones, cuyos miembros serán designados por el Consejo Académico y el Comité de Doctorado será un ente asesor del Consejo de Investigaciones, entre otros. Se advierte que como tareas inmediatas estará el proponer la reglamentación

Formato ME-GE-2.2-FOR-6

VE



Acta de reunión

para crear los Comités de Área y del Comité de Doctorado, las cuales se abordarán al inicio del primer período del 2012.

El profesor Jairo Tocancipá Falla Ph.D. informa que viene participando en las reuniones de trabajo programadas por ASPU Cauca para la discusión de la reforma a la ley 30 y señala que se establecerán mesas de trabajo. Así mismo, se excusa de no asistir a la próxima reunión por encontrarse en el municipio de Guapi, en desarrollo de un proyecto cofinanciado por Colciencias.

Agotado el orden del día la sesión se levanta a las 11:00 A.M.

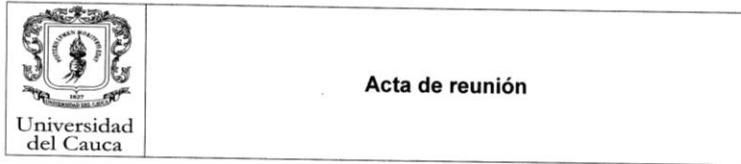
Eduardo Rojas Pineda
Vicerrector de Investigaciones

Ismenia Ardila Díaz
Profesional Especializado

- Anexo 1. Control de asistencia
- Anexo 2. Adenda 1 V Convocatoria Proyectos
- Anexo 3: Adenda 1 VII Convocatoria Proyectos

Formato ME-GE-2.2-FOR-6

Anexo 6. Aval Ético otorgado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca



Ciudad	Popayán			Dependencia responsable de la reunión		Vicerrectoría de Investigaciones
Fecha	Día	Me s	Año	Hora Inicio	Hora Finalización	Lugar de desarrollo
	12	9	2011	8:30 a.m.	10:00 a.m.	Vicerrectoría de Investigaciones
						ACTA No.
						6-1.25/32

ORDEN DEL DÍA

1. Verificación de Asistencia y aprobación del orden del día
2. Lectura y aprobación de acta No 31 del 25 de noviembre de 2011
3. Estudio de proyectos para aval
4. Varios

DESARROLLO

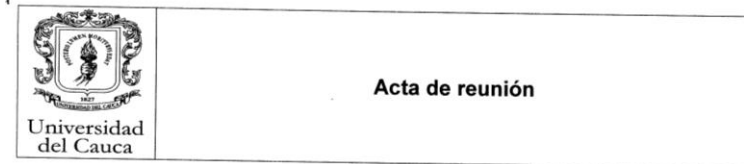
1. Asisten los profesores Franklyn Fajardo, Yolanda Botero y Patricia Vélez.
2. Se aprueba el acta No 31 del 25 de noviembre de 2011 con algunos ajustes sugeridos.
3. Se revisan los siguientes proyectos para aval ético:

3.1. Proyecto de grado del programa de biología titulado "Evaluación citotóxica y genotóxica de la exposición crónica al humo de biomasa mediante la prueba de micronúcleos en células de los epitelios bucal y nasal, en un grupo de mujeres expuestas, pertenecientes a zonas rurales aledañas al municipio de Popayán, Cauca", bajo la dirección de la profesora Nohelia Cajas Salazar. El comité de Ética le otorga el aval con las siguientes recomendaciones:

- En el Consentimiento informado, suprimir el texto inicial y empezar con la información principal, es decir a partir de: "Las estudiantes María Mercedes..."
- Incluir en la metodología: "Las muestras solo serán usadas para los propósitos de esta investigación y no podrán usarse para nuevas investigaciones", salvo que se autorice mediante un consentimiento amplificado (aparte) en este sentido.
- Agregar en el Manejo de la Confidencialidad, antes del último párrafo: Los resultados de esta investigación no podrán ser usados para ningún tipo de discriminación social, étnica, cultural, política, económica, religiosa, laboral, etc.
- En el último párrafo, donde el sujeto da constancia de su conocimiento, modificar así: "He leído este consentimiento, he entendido en qué consiste el estudio y también se me aclararon las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar..."

3.2. Proyecto de grado de la especialización en anestesiología titulado "Concordancia entre la decisión clínica de extubación con la medición del tren de cuatro en pacientes bajo efectos de relajantes neuromusculares en salas de cirugía del hospital universitario San José en el periodo octubre 2011 a marzo de 2013", bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Caicedo, director del grupo GRIAN.

El Comité de Ética le otorga el aval con las siguientes recomendaciones:



- En el Consentimiento informado agregar: Los resultados de esta investigación no podrán ser usados para ningún tipo de discriminación social, étnica, cultural, política, económica, religiosa, laboral, etc.

3.3. Se revisa el proyecto de grado titulado "Contribuciones sociales en la conservación de los bosques tropicales. El caso de los manglares y los mangleros en la bahía de Cispatá, departamento de Córdoba, Colombia", al cual se le hicieron recomendaciones mediante comunicación 6-1.25/2021 del 7 de octubre de 2011.

Se advierte que se ajustó el formato VRI en la metodología y los aspectos éticos legales y se adiciona un borrador de documento titulado "Cesión voluntaria de documentos" el cual es adecuado. Sin embargo, se acuerda una comunicación al investigador indicándole que adicionalmente todo proyecto que involucre comunidades nativas se debe contar con un documento firmado por sus autoridades o representantes, autorizando el suministro de información y el compromiso de cooperación con la investigación. Así mismo, el investigador debe adelantar la socialización y entrega oficial de los resultados obtenidos, dejando las respectivas constancias y soportes del proceso.

Agotado el orden del día la reunión se termina las 10:00 a.m.

Dr. Franklyn Fajardo Sandoval
Presidente Comité de Ética

Anexo 1. Control de Asistencia

Ismenia Ardila Diaz
Profesional Especializado

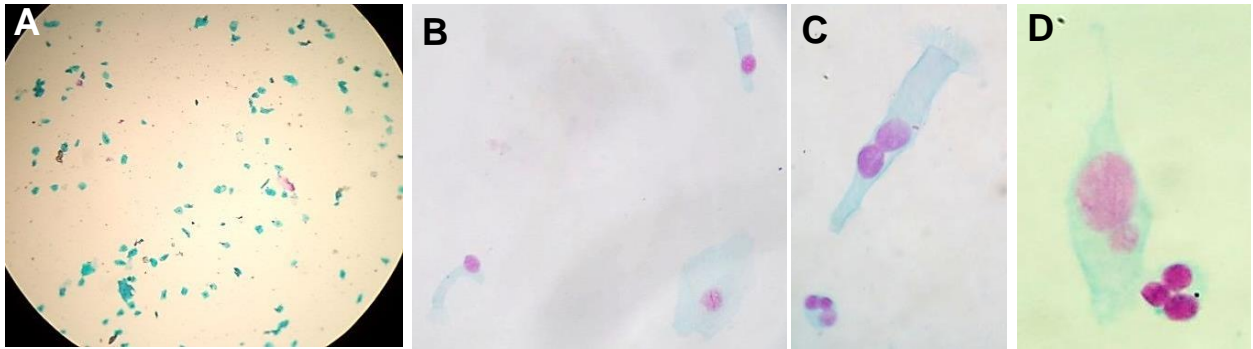
Anexo 7. Formato de registro de los biomarcadores evaluados.

“EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE BIOMASA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE LOS EPITELIOS BUCAL Y NASAL, EN UN GRUPO DE MUJERES EXPUESTAS PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, CAUCA”

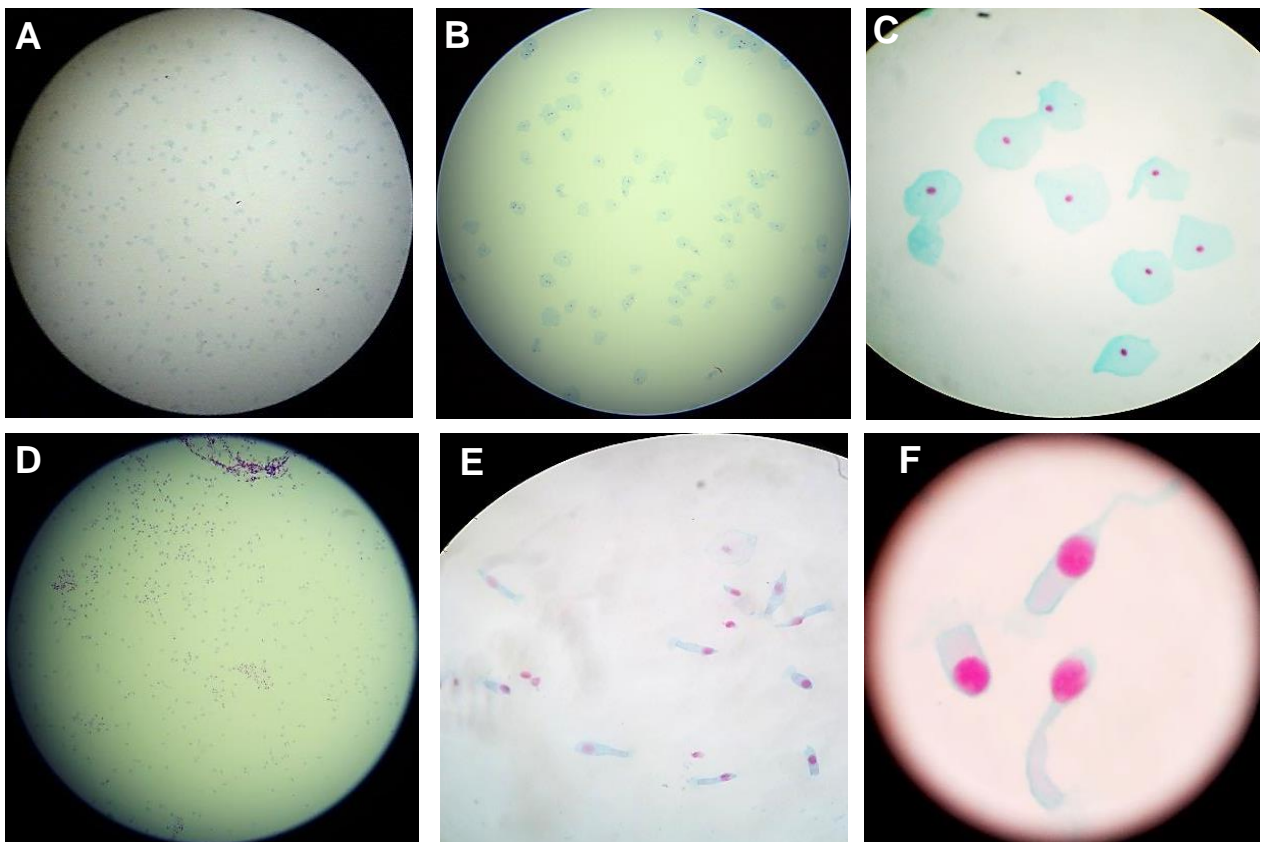
CÉLULAS DEL EPITELIO NASAL													
Microscopio										Fecha			
Código	Diferenciada		Micronúcleo		Foto	Brote Nuclear		Foto	Binucleada		Foto	Tri o Polinucleada	Foto
			X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
	Subtotal		X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
			X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
	Otras		X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
Ciego	Subtotal		X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
	Basal		X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
			X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
			X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
			X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
Subtotal			X=	y=		X=	y=		X=	y=		X=	y=
Notas	Total	Superficie de la placa			Contraste en la tinción			Dispersión celular			Densidad celular		

CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL													
Microscopio										Fecha			
Código	Diferenciada		Condensada	Cariorréctica	Picnótica	Cariolítica	Binucleada	Micronúcleo		Foto	Brote Nuclear		Foto
	1 ^{er} conteo							X=	y=		X=	y=	
	Con MN y BrN							X=	y=		X=	y=	
	-2000							X=	y=		X=	y=	
	2 ^{do} conteo							X=	y=		X=	y=	
Ciego	Subtotal							X=	y=		X=	y=	
	Basal							X=	y=		X=	y=	
								X=	y=		X=	y=	
								X=	y=		X=	y=	
								X=	y=		X=	y=	
Subtotal								X=	y=		X=	y=	
Notas	Total	Superficie de la placa			Contraste en la tinción			Dispersión celular			Densidad celular		

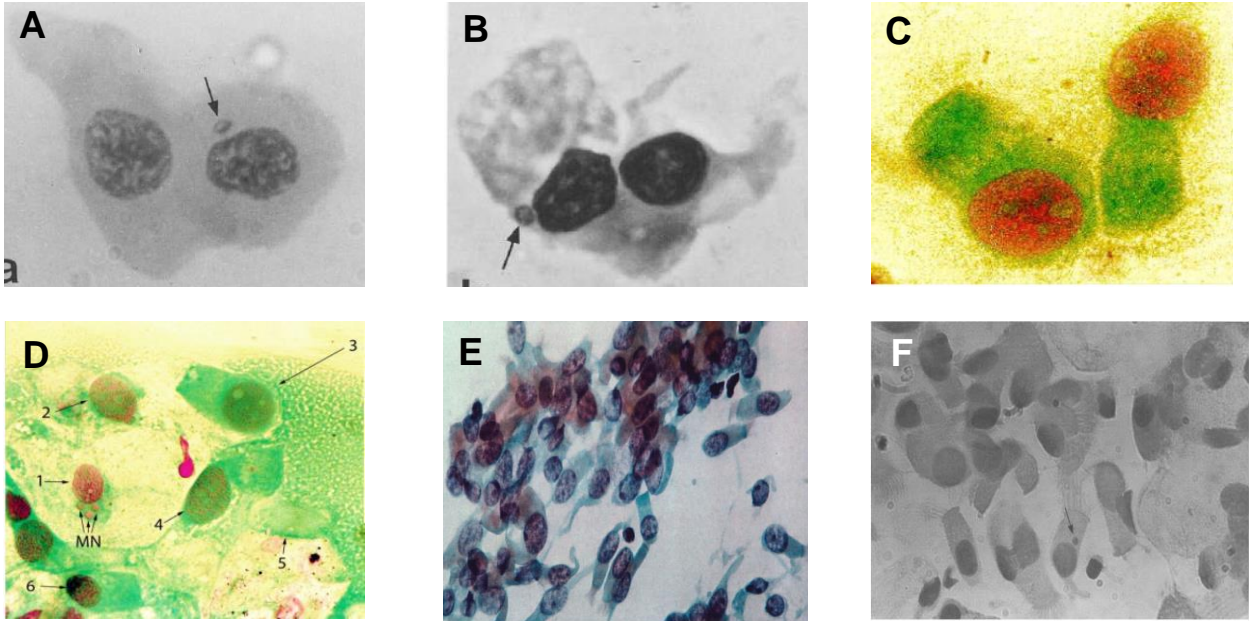
Anexo 8. Algunos tipos de células de la cavidad nasal. **A)** Células escamosas del epitelio estratificado vestibular nasal aumento 10X. **B)** Dos células columnares del epitelio pseudoestratificado respiratorio nasal y una escamosa del epitelio vestibular nasal, aumento 40x. **C)** Granulocito neutrófilo junto a una célula columnar binucleada, aumento 100x. **D)** Granulocito neutrófilo junto a una célula columnar con un Brote nuclear, aumento 100x. (Fuente propia)



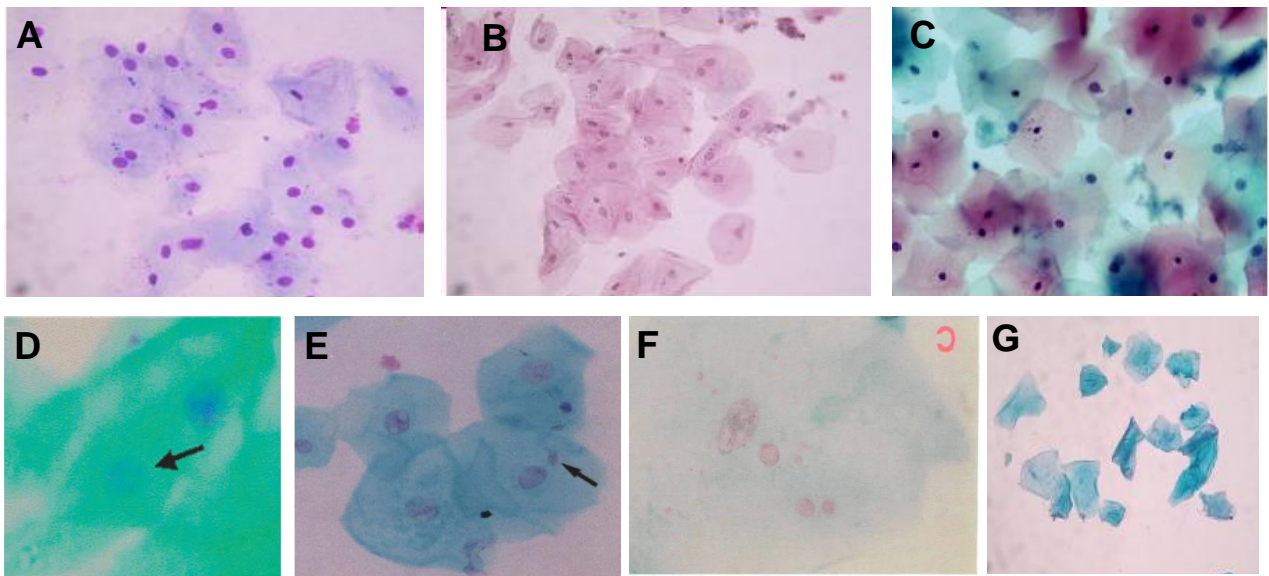
Anexo 9. Campos donde se muestran células escamosas del epitelio bucal y células columnares ciliadas del epitelio nasal. **A) - C)** Células escamosas del epitelio de la mucosa de revestimiento de las mejillas aumento 4x, 10x y 40x respectivamente. **D)- F)** Células columnares del epitelio pseudoestratificado respiratorio nasal, aumento 10x, 40x y 100x respectivamente. (Fuente propia).



Anexo 10. Fotos de células nasales normales y con anomalías nucleares reportadas en los estudios que emplean el epitelio nasal. **A)** Dos células escamosas exfoliadas de la mucosa nasal, una de ellas con MN, aumento de 1600 x. **B)** Dos células respiratorias vacuolizadas, una de ellas con MN aumento de 1600 x. **C)** Célula columnar ciliada normal. **D)** Células columnares ciliadas: 1. con 3 Mn, 2. Brote nuclear, 3. Célula ciliada normal, 4. cariorrética, 5. cariolítica y 6. condensada. **E)** Células columnares ciliadas normales de la cavidad nasal de un sujeto no expuesto. **F)** Célula ciliada con MN de trabajadores expuestos a formaldehído. Tomado de Sarto *et al.* 1990, Knasmüller *et al.* 2011, Gluck *et al.* (2003) y Ballarin *et al.* 1992.^{46,100,109,272}



Anexo 11. Tinciones empleadas en el epitelio bucal. **A)** Tinción de Giemsa. **B)** Tinción de Hematoxilina. **C)** Tinción de Papanicolaou. **(D-G)** Tinción de Feulgen de algunos artículos: **D)** Célula cariorrética, aumento 100x. **E)** Célula micronucleada (flecha), aumento 100x. **F)** Célula con varios micronúcleos grandes y pequeñas, aumento 1684x. Tomado de Sarto *et al.* (1987), Mendonça & Ladeira (2011), Carlin *et al.* (2014).¹⁹⁴⁻¹⁹⁶



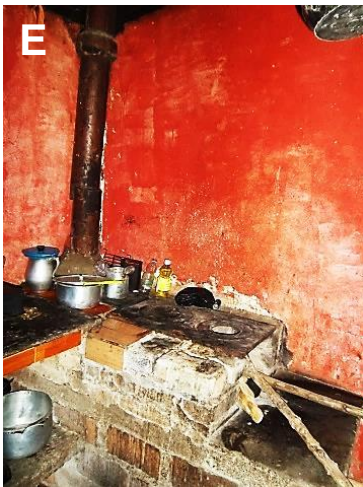
Anexo 12. Ubicación de la cocina en la vivienda. **A) y B)** Cocina ubicada al interior de la vivienda. **C) y D)** Cocina ubicada al exterior de la vivienda. (Fuente propia)



Anexo 13. Ventilación de la cocina. A) y B) Escasa ventilación. C) y D) moderada ventilación. E) y F) Adecuada ventilación. (Fuente propia)



Anexo 14. Tipo de hornilla. **A)** y **B)** Hornilla con cámara de combustión abierta. **C)** y **D)** Hornilla con cámara de combustión semicerrada. **E) - G)** Hornilla con cámara de combustión con chimenea. (Fuente propia)



Anexo 15. Características de la vivienda que modulan la exposición. **A)** Pequeñas aberturas hacia el interior de la vivienda. **B)** Grandes aberturas hacia el interior de la vivienda. **C)** y **D)** acumulación de hollín en el techo y paredes de la cocina. (Fuente propia)



Anexo 16. Exposición ocupacional al humo de leña. **A)** y **B)** Horno fabricado con barro y paila que se emplean para la preparación de alimentos que las mujeres llevan a la plaza de mercado. (Fuente propia)



