

**“FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS ASOCIADAS CON LA
EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE LEÑA COMO UN FACTOR DE RIESGO EN LA
SALUD DE MUJERES EXPUESTAS, PERTENECIENTES A ZONAS RURALES
ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, (CAUCA)”**

**CLAUDIA PATRICIA BRAVO CHAUCANÉS
CLARA LUCIA LEÓN ANNICCHIARICO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2008**

“FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS ASOCIADAS CON LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL HUMO DE LEÑA COMO UN FACTOR DE RIESGO EN LA SALUD DE MUJERES EXPUESTAS, PERTENECIENTES A ZONAS RURALES ALEDAÑAS AL MUNICIPIO DE POPAYÁN, (CAUCA)”

**CLAUDIA PATRICIA BRAVO CHAUCANÉS
CLARA LUCIA LEÓN ANNICCHIARICO**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogos

NOHELIA CAJAS SALAZAR. Ph, D

Directora

SILVIO MARINO CARVAJAL. MSc

ADRIANA MARIA MUÑOZ. Biol

Asesores

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2008**

Nota de aceptación

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

Jurado Mg. Rosa Elvira Álvarez

Jurado Mg. Patricia E. Vélez

Popayán, Fecha de sustentación 20 de octubre de 2008

DEDICATORIA

*A mi madre,
A quien agradezco su incondicional apoyo,
Su amor constante,
Y sus palabras de ánimo en los momentos difíciles*

Clara L. León A

*A mi Padres,
A quienes agradezco de todo corazón
Su amor, cariño y comprensión.
En todo momento los llevo con migo*

Claudia P. Bravo Ch.

AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta tesis no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaremos y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia.

Gracias a Dios, por guiar y bendecir nuestros pasos, por fortalecer nuestro corazón e iluminar nuestras mentes y por haber puesto en el camino a aquellas personas que han sido compañía y soporte durante todo el periodo de estudio.

A Nuestros Padres, hoy y siempre por ser nuestra vida, alegría, comprensión y dedicación; por todo el apoyo constante necesario para salir adelante y por encomendarnos siempre con Dios para que saliéramos adelante. Sabemos que sus oraciones fueron escuchadas.

A Nuestros Hermanos y Familiares, por acompañarnos y apoyarnos con sus frases de ánimo.

A Nuestra Directora de Tesis, por su asesoría y dirección, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Profesor Silvio Carvajal, por ser un gran educador, dispuesto a colaborar a cualquier hora del día, por su generosidad al brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de afecto y amistad.

A La Profesora Luz Stella Hoyos, por su calidez como docente, por sus valiosas críticas y enseñanzas; su colaboración y paciencia; por escucharnos y aconsejarnos.

A Adriana Muñoz, por la colaboración brindada durante el énfasis y el desarrollo de nuestra tesis; por todos los momentos compartidos, por el ánimo, cariño y amistad que nos brindó.

A Nuestras Juradas Patricia Vélez y Rosa Álvarez, por su disposición y sugerencias brindadas.

A Elsa Velasco enfermera auxiliar del Laboratorio, por su colaboración en la toma de muestras de sangre y por los comentarios con los que muchas veces nos hizo reír.

A Luis Alfonso, Luisa Escobar, Ingrid Reyes y Patricia Mosquera, en la búsqueda de mejores conocimientos y aportes científicos en la elaboración de nuestra tesis y a todos nuestros amigos que vivieron nuestro proceso de aprendizaje en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética.

A las Mujeres de las distintas comunidades, veredas y asentamientos del municipio de Popayán, por su colaboración como donadores y a todas aquellas personas que nos

colaboraron e hicieron posible la realización de esta investigación, en especial a Don Carlos presidente de la junta comunal de Clarete, Yanet Mosquera líder comunal del asentamiento Pubus, Alex Casamachín vocero de la vereda Santa Helena, Doña Irene habitante de la vereda Punta Larga y Carlos Calero.

A la Universidad del Cauca y al Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por ser el soporte de todo nuestro crecimiento y desarrollo profesional.

Y a todas aquellas personas, que indirectamente colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hacemos extensivo nuestro más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

	Pág.
Introducción	13
1. Planteamiento del problema	15
2. Hipótesis	18
3. Justificación	19
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. Marco teórico	22
5.1 Humo de leña	22
5.1.1 Componentes del humo de biomasa	22
5.1.2 Concentraciones de partículas finas del humo de leña	24
5.2 Monitoreo Biológico	24
5.3 Biomarcador	25
5.4 Linfocitos de sangre periférica	25
5.5 Índice Mitótico (IM)	25
5.6 Prueba de alteraciones cromosómicas	26
5.6.1 Alteraciones cromosómicas numéricas	27
5.6.2 Alteraciones cromosómicas estructurales	27
5.6.2.1 Alteraciones tipo cromosómico	27
5.6.2.2 Alteraciones tipo cromatídico	27
5.7 Mecanismo de formación de las alteraciones cromosómicas	28

6. Antecedentes	29
7. Metodología	33
7.1 Tipo de estudio	33
7.2 Población objeto de estudio	33
7.3 Adquisición de las muestras de sangre periférica	33
7.4 Estandarización de las muestras de sangre periférica	33
7.5 Cultivo y cosecha de linfocitos	35
7.6 Diseño experimental y análisis estadístico	36
7.6.1 Criterios de inclusión	36
7.6.2 Criterios de exclusión	36
7.6.3 Tipo de variables	37
8. Resultados y Discusión	38
8.1 Características de la población objeto de estudio	38
8.2 Efecto citotóxico por la exposición al humo de leña	40
8.3 Efecto genotóxico por la exposición al humo de leña	43
8.4 Efecto de las variables cualitativas y cuantitativas (factores) registradas mediante encuesta, sobre el IM y la frecuencia de ACs	49
9. Impacto	57
10. Conclusiones	58
11. Recomendaciones	60
Anexos	61
Bibliografía	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales agentes contaminantes y efectos tóxicos del humo de biomasa	23
Tabla 2. Estudios que demuestran daño citogenético por exposición a combustibles de biomasa	30
Tabla 3. Características sociodemográficas de la población de estudio	39
Tabla 4. Efecto de la exposición crónica al humo de leña en el Índice Mitótico y la Frecuencia de ACs	42
Tabla 5. Efecto de las variables (factores) en el IM y la Frecuencia de ACs	50
Tabla 6. Asociación entre las características particulares de la población expuesta al humo de leña y las Alteraciones Cromosómicas	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Protocolo para cultivo de linfocitos humanos aplicado para prueba de citotoxicidad (IM) y Alteraciones Cromosómicas (ACs)	35
Figura 2. Efecto de la exposición al humo de leña en el Índice Mitótico	42
Figura 3. Asociación entre el N° de ACs/100 células y los grupos de estudio	43
Figura 4. Ruptura cromatídica en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas al humo de leña	48
Figura 5. Ruptura cromosómica en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas al humo de leña	48
Figura 6. Análisis de la asociación entre la frecuencia de ACs y el tiempo de exposición al humo de leña	53
Figura 7. Asociación entre la frecuencia de ACs y la edad de mujeres expuestas al humo de leña	56
Figura 8. Categorización de la edad de mujeres expuestas al humo de leña con relación a la frecuencia de ACs	56

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Encuesta Corta	61
Anexo B. Encuesta Larga	62
Anexo C. Consentimiento Informado	63
Anexo D. Registro de Alteraciones Cromosómicas	65

RESUMEN

Uno de los factores ambientales de mayor impacto en la salud humana de las comunidades agrícolas de los países en desarrollo, ha sido la exposición al humo de la combustión de biomasa. La Organización Mundial de la Salud estima que unos tres mil millones de personas en el mundo (el 50% de los hogares de los cuales el 90% son hogares rurales de países en desarrollo) dependen de los combustibles sólidos para satisfacer sus necesidades. En el 2006 el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) revisó los datos mundiales y clasificó el humo de combustión de la biomasa en los hogares como probable carcinógeno humano. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico causado por la exposición ambiental del humo de leña en 36 mujeres saludables, de zonas rurales aledañas al Municipio de Popayán (Cauca), con un rango de exposición no menor a 10 años y 28 mujeres no expuestas al factor de riesgo y con características semejantes al grupo expuesto. Las pruebas citogenéticas usadas fueron: Índice Mitótico (IM) y Alteraciones Cromosómicas (ACs), a partir de la extracción de linfocitos de sangre periférica cultivados y procesados in vitro en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca.

Los resultados indicaron una diferencia significativa de ambos biomarcadores en la población objeto de estudio. Las mujeres expuestas presentaron una reducción del IM ($p=0,009$) y una elevada frecuencia de ACs ($p=0,000$) respecto al grupo referente, donde predominaron las alteraciones tipo cromatídico. Tal diferencia entre ambos grupos, se debe a que varios de los constituyentes presentes en el humo de leña ejercen efectos citotóxicos y genotóxicos. Por medio de un análisis de correlación lineal, los factores de confusión como, edad, consumo de vegetales, consumo de bebidas alcohólicas, nivel de educación, antecedentes familiares con malformaciones y ex fumador, no presentaron asociación con el IM ni con la frecuencia de ACs. Mientras que Antecedentes familiares con cáncer si presentó asociación con ACs ($p=0.027$).

Al evaluar el grupo de mujeres expuestas, se encontró que el tiempo de exposición afectó significativamente el índice mitótico ($p=0,027$); al ajustar el tiempo de exposición y la frecuencia de ACS con una prueba paramétrica ($n>30$), la significancia fue de ($p=0.045$). Por otro lado, la edad mostró una leve asociación con la frecuencia de ACs de las mujeres que se encontraron en un rango de edad de 54 a 75 años ($p=0.085$).

Los resultados del presente estudio, elucidan la importancia de los biomarcadores citogenéticos en la evaluación de personas saludables, expuestas a distintos contaminantes tóxicos producto de la combustión de biomasa y en el posible riesgo a desarrollar enfermedades. Razón por la cual es importante incluir programas de intervención que busquen mejorar las condiciones de la quema de biomasa y que contribuyan en procesos de prevención de la población afectada.

Abreviaciones: **IM** Índice Mitótico, **ACs** Alteraciones Cromosómicas, **ACTs** Ruptura tipo cromatídica, **ACSs** Ruptura tipo cromosómica, **MN** Micronúcleos, **ICHs** Intercambio de Cromátidas hermanas, **HAPs** Hidrocarburos aromáticos policíclicos, **PM** Material particulado con diámetro menor a 10 y 2.5µm, **ROS** Especies reactivas de oxígeno.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) las actividades laborales, económicas y cotidianas necesarias para el desarrollo de las sociedades, representan riesgos para la salud y para el medio ambiente. Estos riesgos se presentan por las condiciones ambientales inseguras en el lugar de trabajo, en un lugar ocasional o por el estilo de vida (OPS, 2001). Los efectos negativos sobre la salud que se pueden producir como consecuencia de la exposición a diferentes agentes ambientales (agentes biológicos, químicos o físicos), pueden tardar años en manifestarse. Los estudios de biomonitorio son de gran importancia porque intentan establecer la relación entre factores ambientales y enfermedad, evaluando las lesiones genéticas primarias que no se repararon y se acumularon durante varios años de exposición y detectando dichas alteraciones iniciales en fases premalignas (Herrick, 2001).

La contaminación ambiental es una significativa causa de morbilidad y mortalidad. Los más grandes impactos en la salud por la contaminación ambiental en el mundo entero ocurren en las más pobres y vulnerables poblaciones. Aproximadamente el 76% de todo el material particular global se genera en ambientes intradomiciliarios en países en vía de desarrollo (Smith, 1993). Uno de los factores ambientales de mayor impacto en la salud humana de las comunidades agrícolas de los países en desarrollo, ha sido la exposición al humo de la combustión de biomasa (Delgado *et al*, 2005). La Organización Mundial de la Salud estima que unos tres mil millones de personas en el mundo (el 50% de los hogares de los cuales el 90% son hogares rurales de países en desarrollo) dependen de los combustibles sólidos como la leña, estiércol, carbón y residuos agrícolas para satisfacer sus necesidades básicas de energía (WHO, 2000; Desai *et al*, 2004; Rehfuess *et al*, 2006). Dentro de la población expuesta, los niños y las mujeres, son los más perjudicados, debido a la constante permanencia en el hogar y al oficio desempeñado en la cocina (Albalak, 1997; Smith, 2002; Ezzati y Kammen, 2002; Manuel, 2003). Se calcula que en los países en desarrollo ocurren 1,849,000 muertes al año asociadas con la exposición al humo de la combustión de biomasa en las viviendas y que para el 2015 esta cifra habrá aumentado a 700 millones de personas, debido a que los sitios donde se quema la biomasa, son espacios que cuentan con una ventilación deficiente (Vargas y Buka, 2006).

El humo de leña presenta efectos devastadores sobre la salud de las personas expuestas. La mayoría de las enfermedades y muertes ocasionadas por esta exposición, se manifiestan en: infección respiratoria aguda, bronquitis crónica, enfermedad cardiovascular, tuberculosis, asma, cataratas, otitis media, muerte del niño antes de nacer, bajo peso al nacer, mortalidad del lactante, cáncer de pulmón, boca y laringe; esto independiente de la exposición al humo de cigarrillo (Pérez *et al*, 1999; Ko *et al*, 2000; Bruce *et al*, 2000; Boy *et al*, 2002; Mishra, 2003; Pokhrel *et al*, 2005; Delgado *et al*, 2005; Pandey *et al*, 2005; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial República de Colombia, 2007).

Existe evidencia suficiente de los efectos nocivos de la combustión de biomasa en la salud humana; sin embargo existen pocos estudios sobre los efectos en el material genético, bajo condiciones particulares como estilo de vida, ambiente, etnicidad, edad, estrato socio-económico y consumo de vegetales. Por lo tanto es de gran importancia llevar a cabo estudios de monitoreo genético de poblaciones expuestas a humo de leña, mediante biomarcadores citogenéticos como Alteraciones cromosómicas (ACs) e Índice Mitótico, los cuales van a permitir conocer si hay algún efecto genotóxico y citotóxico en las células; además, observar si condiciones de vida particulares de distintas poblaciones influyen en el resultado final del biomarcador de interés.

Hasta la actualidad se han desarrollado varios ensayos biológicos a corto plazo para la identificación de agentes genotóxicos. Una de las pruebas citogenéticas, mayormente empleada para la evaluación de efectos o riesgo genotóxico, ha sido la prueba de Alteraciones Cromosómicas (ACs) en linfocitos de sangre periférica, la cual ha sido aceptada como una técnica para el monitoreo biológico de daño genético en células somáticas desde comienzos de 1970. Asumiendo que su importancia radica en que los mecanismos de formación de daño cromosómico son similares en los distintos tejidos, el nivel de daño en los linfocitos se espera que refleje el nivel de daño en tejidos precancerígenos e indique riesgo de cáncer (Bonassi *et al*, 2005; Norppa *et al*, 2006).

Para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de la exposición crónica al humo de leña en nuestra población, se llevó a cabo un estudio de tipo *cross-sectional* donde se colectaron un grupo de 36 mujeres expuestas al humo de leña, pertenecientes a las zonas rurales aledañas al Municipio de Popayán, y un grupo de 28 mujeres no expuestas de condiciones similares (socioeconómicas, edad, nivel de escolaridad, dieta, y estilo de vida) conformaron el grupo referente. Los resultados sirven de base científica para concientizar a las comunidades de los riesgos presentes en el humo de leña, y para la toma de medidas de promoción y prevención contra posibles riesgos de salud.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las exposiciones ambientales/ocupacionales se han convertido en un problema de salud pública debido a que la incidencia del cáncer de origen ambiental en el mundo va cada vez en aumento, como ya ha sido reconocido (Pott,1775). La más grande fuente de contaminación interior es la combustión de biomasa (Smith, 2002). En el 2006 el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) revisó los datos mundiales y clasificó el humo de combustión de la biomasa en los hogares como probable carcinógeno humano (Straif *et al*, 2006). La WHO identificó que el humo del interior de la combustión de sólidos es uno de los 10 grandes riesgos de carga mundial de enfermedad, siendo el segundo contribuidor ambiental más grande de morbilidad en todo el mundo, superado solo por agua potable y saneamiento (Guilbert, 2003; Ezzati y Lopez, 2004). Según el Ministerio de Ambiente y Vivienda (2006), en Colombia se presentan 6.040 muertes originadas por contaminación atmosférica (aire exterior) y 1.100 muertes por contaminación de ambientes interiores.

La proporción de la energía mundial derivada de combustibles de biomasa ha bajado de un 50% en 1900 a un 13% en el 2000, sin embargo hay evidencias de que sus usos están aumentando en los estratos socioeconómicos desfavorecidos (Albalak, 1997). Los tipos de cocinas utilizados por estas poblaciones son muy ineficientes, ya que emplean sólo del 10 al 15% de la energía (Dasch, 1982), ni siquiera las cocinillas con chimenea eliminan la contaminación en el interior de la casa, ya que a menudo gran cantidad de humo se queda en el aposento o vuelve a la casa desde el exterior (Smith, 1993) (Duncan *et al*, 2008), donde las concentraciones de pequeñas partículas en el interior de la casa pueden alcanzar a largo plazo niveles de 10 a 100 veces superiores a los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005; Pandey *et al*, 1989).

La leña que no arde debidamente, convirtiéndose en dióxido de carbono, da lugar a productos de combustión incompleta muy peligrosos para la salud, básicamente monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y sulfuro, benceno, butadieno, formaldehído, hidrocarburos aromáticos policíclicos, radicales libres y las pequeñas partículas (finas, inhalables y respirables) que incluyen: hollín, cisco, materia orgánica, humo o smog; con diámetros de 10 y menores de 2 micras que pasan las estructuras ciliares de las células del tracto respiratorio y penetran a gran profundidad los pulmones causando inflamación e incrementando el riesgo de sufrir enfermedades respiratorias y del corazón (Craighillv, 1997; Smith *et al*, 1983; Echalar *et al*,1995; Mishra, 2003; Pope *et al*, 2004; Naeher *et al*, 2005).

Estudios realizados en India, Taiwán, Brasil y Guatemala, demuestran que la exposición crónica al humo de leña de las mujeres que se encuentran diariamente en la cocina, incrementa la frecuencia de mutaciones, debido a que la combustión de la biomasa libera muchos compuestos genotóxicos (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, Aminas Aromáticas e Hidrocarburos Aromáticos Nitro-policíclicos) que interactúan con los centros

nucleofílicos del ADN (Boy *et al*, 2002; Kato *et al*, 2004; Ming-Tsang *et al*, 2004; Musthapa *et al*, 2004). Dentro de los principales compuestos procarcinogénicos se encuentran el Benzo(a)pireno (B[a]P), Dibenzo(a,h)antraceno y 2-naphthylamina, 4-aminobiphenol y Aminas Aromaticas Heterociclicas, que requieren activación metabólica para formar daño en el ADN e inducir genotoxicidad (Autrup, 2000; Naeher *et al*, 2005), los metabolitos producidos son muy variables y dependen probablemente de enzimas específicas de activación y detoxificación presentes en las células expuestas (Gülgün S, 2006). Es reconocido que el B[a]P produce daño en el ADN e induce aductos en el ADN, los cuales permanecen sin ser reparados y finalmente se manifiestan como alteraciones cromosómicas estructurales (translocaciones) (Binkova *et al*, 2003). Varias pruebas a corto plazo como el Test de Ames, Intercambio de Cromátidas Hermanas y Prueba de Micronúcleos, corroboran la genotoxicidad de estos compuestos, encontrados en el humo de cigarrillo (Chiang *et al*, 1999; Chiang, Wu y Ko, 1999; DeMarini, 2004; Arboleda-Moreno *et al*, 2004; Palma *et al*, 2007).

Muchos estudios han demostrado que los hidrocarburos policíclicos aromáticos y sus metabolitos, están en niveles mas altos en las personas expuestas al humo de leña, se ha calculado que en algunas viviendas cocinar con leña durante 3 horas diarias expone a las mujeres a cantidades equivalentes a fumar mas de 2 cajetillas de cigarrillos diarias (Smith *et al*, 1983; Brauer y Kennedy, 1996; Riojas-Rodriguez *et al*, 2001). Entre los hidrocarburos poliaromáticos encontrados en el humo de leña, el B[a]P generado de la combustión de todo un día, equivaldría a fumar 450 cigarrillos sin filtro; estos carcinógenos disminuyen la respuesta del sistema inmune en los humanos haciéndolos mas propensos a el desarrollo de enfermedades respiratorias (Sims y Kjellström, 1992), de la misma manera los efectos del oxido de nitrógeno en el sistema inmune pueden incrementar el riesgo de contraer tuberculosis en niños y adultos expuestos (Calle y Zeighami, 1984).

En los territorios más pobres y desprotegidos de Colombia, la madera ha sido el combustible sólido más utilizado para cocinar y para calefacción. Particularmente en el Departamento del Cauca, se ha identificado que la exposición al humo, producto de la combustión de la leña es un factor de riesgo similar al cigarrillo en la etiología de cáncer de pulmón, constituyéndose en un grave problema de salud (Rosero, 2003). El 61 % de la población Caucana pertenece a las zonas rurales del departamento (Perfil del sector educativo departamento del Cauca, 2004), y es este sector de la población el que más utiliza la leña como combustible; sin embargo desconocen el riesgo que éste representa debido a, los agentes químicos involucrados, su efecto mutagénico y las medidas de prevención frente a este agente carcinogénico.

En relación con la problemática planteada, es importante conducir estudios de monitoreo biológico en poblaciones expuestas a este tipo de agentes tóxicos, con el fin de conocer si la intensidad de la exposición, su impacto en la salud, el riesgo a enfermedades y el efecto de variables como: estilo de vida, condiciones ambientales específicas, dieta, estrato socioeconómico, tiempo de exposición y edad puedan estar involucrados en los problemas de salud. Con este estudio se buscó determinar el efecto genotóxico y citotóxico ocasionado por la exposición ambiental al humo de leña mediante la prueba de

Alteraciones Cromosómicas e Índice Mitótico, bajo la siguiente hipótesis: Si la frecuencia de ACs es mayor en el grupo expuesto que en el grupo referente; si la frecuencia de ACs se ve alterada con la edad y tiempo de exposición al humo de leña y si la proliferación celular está afectada por la exposición, entonces la exposición crónica al humo de leña sería un factor predictor de riesgo de enfermedad en las mujeres de las zonas rurales aledañas al municipio de Popayán.

2. HIPOTESIS

Si los compuestos tóxicos generados por la combustión de la leña interactúan con los linfocitos de mujeres expuestas al humo de leña afectando el ciclo normal de proliferación celular (efecto citotóxico), entonces es de esperar que el Índice Mitótico (número de células en proliferación) sea estadísticamente diferente al Índice Mitótico de linfocitos de mujeres no expuestas (H1), de lo contrario, la frecuencia del índice mitótico de las células será igual e incluso mayor (H0).

Si los compuestos tóxicos generados por la combustión de la leña interactúan con el ADN (efecto genotóxico) de linfocitos de mujeres expuestas, es de esperar que en promedio haya un mayor número de alteraciones cromosómicas (AC) que el registrado en linfocitos de mujeres no expuestas (H1), de lo contrario, la frecuencia promedio de células con alteraciones será igual o incluso menor (H0).

3. JUSTIFICACIÓN

Múltiples factores de riesgo son responsables de una amplia variedad de enfermedades, estos podrían ser categorizados como factores ambientales/ocupacionales, genéticos y estilo de vida (Au, 2001). Debido al sin número de agentes potencialmente nocivos para la salud, es de vital importancia establecer el riesgo que representan estos para el ser humano, mediante estudios que evalúen el efecto citotóxico y genotóxico causado por la exposición crónica al humo de leña.

La relación entre el cáncer ocupacional/ambiental y la exposición a diferentes sustancias ha sido determinada desde 1775 por Pott Percival y en la actualidad continúan surgiendo evidencias que demuestran tal asociación (Bonassi *et al*, 2005; Norppa *et al*, 2006). El humo de tabaco y la contaminación del aire interior derivado del estilo de cocinar y/o quema de biomasa ha demostrado ser una de las mayores causas de cáncer de pulmón en algunos países del mundo (Kleinerman *et al*, 2000; Metayer *et al*, 2002). Teniendo en cuenta el riesgo potencial causado a la salud por el humo de leña y la suficiente evidencia de riesgo carcinogénico en animales, la IARC en el 2006 ha clasificado la exposición al humo de leña en el grupo 2A “Probablemente carcinogénico para humanos”. Dejando en claro que la carcinogenicidad en animales generada por el humo de leña es mediada por mecanismos celulares similares en humanos (IARC, 2006).

Hay suficientes pruebas que sugieren que el humo intradomiciliario ejerce muchos efectos sobre la salud, aunque su rol en la transición epidemiológica no se comprende totalmente. Según un estimado reciente, la quema de combustibles domésticos sólidos, da cuenta de unos 2,5 millones de muertes prematuras cada año, alrededor de 6-7% de la carga mundial de enfermedad, y considerablemente más que la proporción debida a la contaminación atmosférica ambiental urbana (Mishra, 2001). La contaminación en el interior de cocinas por la combustión de biomasa ha sido asociada con muchas enfermedades comunes que incluye infecciones respiratorias agudas, infecciones de oído, cánceres nasofaríngeos y de laringes, enfermedades perinatales, enfermedades en los ojos, deficiencia inmune pulmonar, infección respiratoria aguda (IRA), bronquitis crónica, autismo, neumonía intersticial crónica, hipertensión arterial, tuberculosis, muerte del niño antes de nacer, asma, fibrosis, adenocarcinomas, cataratas y cáncer (Smith, 1987; Smith, 2000; Boy, 2002; Kleinerman *et al.*, 2002; Bruce *et al*, 2002; Kato *et al*, 2004; Schei *et al*, 2004; Pokhrel *et al*, 2005; Delgado *et al*, 2005; Pandey *et al*, 2005; Smith, 2006).

Existen una gran cantidad de estudios epidemiológicos sobre la toxicología de la exposición a las emisiones de quema de leña, los cuales evidencian cómo esta exposición afecta negativamente la salud humana. Los estudios toxicológicos en animales también contribuyen a una mejor comprensión de los posibles mecanismos por los cuales el humo de leña y su material particulado asociado, puede actuar incrementando la enfermedad pulmonar en individuos expuestos. Gracias a los estudios toxicológicos del humo de leña,

se han determinado algunos de los efectos de la exposición por largos periodos de tiempo, pero el efecto más claro e irrefutable del humo de leña, y en el que coinciden muchos autores es el impacto significativo en la homeostasis pulmonar y/o exacerbaciones de los procesos en el curso de la enfermedad pulmonar (Naeher *et al*, 2007).

Debido a que las mujeres de las áreas rurales de los países en desarrollo, han desempeñado por décadas la función de la preparación y cocción de los alimentos; esta población finalmente se ha convertido en objeto de un sin número de diferentes padecimientos relacionados con esta actividad. En las dos últimas décadas se ha descrito en Colombia y en otros países en vía de desarrollo, un grupo de pacientes, generalmente del sexo femenino, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), de frecuencia severa, y que nunca han fumado pero que han cocinado con leña en recintos cerrados por muchos años a lo cual se atribuye su enfermedad pulmonar (Maldonado *et al*, 1997). De hecho, se conoce que una gran proporción de mujeres expuestas han sufrido los efectos tóxicos del humo de leña desde el mismo momento de la concepción y continúa en las diferentes etapas de su vida; niñez, adolescencia, adultez y maternidad (Mishra, 2001; Desai *et al*, 2004) Estudios epidemiológicos demuestran que ciertas enfermedades asociadas a dicha exposición, presentan mayor incidencia en la mujer que en el hombre (Pokhrel *et al*, 2005; Delgado *et al*, 2005).

Pocos estudios han sido reportados en la literatura donde se evalúe la exposición crónica al humo de leña con el biomarcador de Alteraciones Cromosómicas. En las bases de datos de ciencias naturales y ciencias biomédicas como PubMed, Medline y Google Scholar, solo existe un estudio realizado por Musthapa *et al*, (2004) el cual evalúa el efecto genotóxico de la exposición crónica al humo de leña y el biomarcador de interés Alteraciones Cromosómicas (ACs). Se hace pertinente desarrollar este estudio en nuestra población para determinar el daño citotóxico y genotóxico causado por este tipo de exposición ambiental, en mujeres expuestas al humo de leña por un tiempo mínimo de 10 años. Otra razón que justifica llevar a cabo este tipo de investigación es la ausencia de publicaciones científicas realizadas en poblaciones latinoamericanas o colombianas, lo cual es un factor de mucha relevancia a la hora de determinar factores de riesgo asociados a condiciones específicas de cada población humana (estilo de vida, etnicidad, dieta, ambiente, estrato socioeconómico y edad).

Las estrategias para la socialización de los resultados obtenidos en este estudio incluyen: realización de charlas educativas a la comunidad para informar acerca de los efectos tóxicos de los componentes producidos en la combustión de la madera y otros materiales usados como fuente de combustible. Presentación en eventos científicos locales y nacionales, no solo para las personas pertenecientes a nuestra región, sino también para aquellos individuos afectados de otros sectores del País. Publicación de resultados con el propósito de incentivar al diseño de programas educativos de vigilancia epidemiológica ambiental y prevención contra el desarrollo de enfermedades.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el efecto citotóxico y genotóxico inducido por la exposición crónica al humo de leña residencial como un factor de riesgo en la salud de mujeres pertenecientes a zonas rurales aledañas al municipio de Popayán, Cauca.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar *in vitro/ex vivo*, el efecto citotóxico de la exposición crónica al humo de leña, en linfocitos de sangre periférica de mujeres expuestas, mediante la prueba de Índice Mitótico.

Establecer el efecto genotóxico del humo de leña mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs) en linfocitos cultivados *in vitro/ex vivo* de mujeres expuestas.

Evaluar si el tiempo de exposición al humo de leña y la edad de los individuos, alteran la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas.

Socializar los resultados por medio de charlas con todas aquellas personas que participen en el estudio y con todas las que estén interesadas en conocer sobre el tema, con el fin de dar a conocer los posibles efectos negativos de la exposición crónica al humo de leña y crear medidas preventivas contra el desarrollo de enfermedades.

5. MARCO TEORICO

5.1 HUMO DE LEÑA

La exposición al humo de biomasa ha sido señalada por el Banco Mundial, como uno de los cuatro problemas más críticos en los países en desarrollo (Mishra, 2001). Se considera combustible de biomasa cualquier material derivado de vegetales o animales que es quemado deliberadamente por el ser humano. La leña es el ejemplo más común, aunque el uso de estiércol animal y de restos de cosechas también está muy extendido (De Koning *et al*, 1985). En los países desarrollados, la modernización se ha visto acompañada por el abandono de los combustibles de biomasa, en favor de los derivados del petróleo y la electricidad. En los países en desarrollo, en cambio, la pobreza es una de las principales barreras que se oponen a la adopción de combustibles más limpios (WHO, 2000).

5.1.1 Componentes del humo de biomasa. Existe una gran cantidad de compuestos específicos generados por la combustión de la leña; según Cooper se generan diecisiete tipos de sustancias consideradas "contaminantes prioritarios", los cuales forman el 4.8% del total de las partículas. Más de catorce compuestos carcinógenos que representan alrededor del 0.5% de las partículas. Seis compuestos tóxicos para los cilios y agentes muco-coagulantes, y cuatro precursores del cáncer (Smith, 1987). En el caso de del material particulado (PM), específicamente las partículas menores a 10 micras (PM10) y a 2.5 micras (PM2.5), pueden ocasionar los daños más desfavorables para la salud. Altas exposiciones a estos componentes pueden afectar el sistema respiratorio, los ojos, y la respuesta del sistema inmune, y aumentar la susceptibilidad a las infecciones y a las enfermedades (USEPA, 1997).

Durante el proceso de combustión mezclas complejas de sustancias orgánicas son emitidas e incluyen: *Gases inorgánicos*; principalmente monóxido de carbono (CO) el cual se origina de la combustión incompleta de material orgánico, ozono (O₃) un producto secundario de los óxidos de nitrógeno de hidrocarburos, dióxido de nitrógeno (NO₂) el cual se produce de la oxidación a altas temperaturas del nitrógeno del aire. *Hidrocarburos*; el más representativo es el benceno, que se origina de la combustión incompleta de material orgánico. *Aldehídos*; la acroleína y el formaldehído (HCHO) se producen por la combustión incompleta del material orgánico. *Partículas*; entre las partículas encontramos tres grupos según el tamaño de estas: Partículas inhalables (PM10), se forman por la condensación de los gases de la combustión, además por la combustión incompleta de material orgánico. Son partículas gruesas y finas, no pueden ser transportadas a largas distancias y la mayor proporción está compuesta por tierra y cenizas. Partículas respirables, también se producen por la condensación de los gases de la combustión y por la combustión incompleta del material orgánico. Partículas finas (PM2.5), tienen el mismo origen de las partículas respirables solo que por su disminución en el tamaño, son

más fácilmente transportadas (Naehler *et al*, 2005). *Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)*; el benzo(a)pireno (BaP), se produce de la condensación de los gases de la combustión y por la combustión incompleta de material orgánico, las diferentes especies de este compuesto varían según composición de la biomasa y las condiciones de la combustión. *Radicales libres (RL)* y *especies iónicas* (Schauer y Cass, 2000; Leonard *et al*, 2000; Pandey *et al*, 2005). La Tabla 1 resume los principales agentes químicos contaminantes y efectos tóxicos del humo de biomasa, reportados en las referencias originales (Schauer y Cass, 2000; Oros y Simoneit, 2001; Fine *et al*, 2004).

Tabla 1. Principales agentes contaminantes y efectos tóxicos del humo de biomasa

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

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

Tomado de: Critical Review of the Health Effects of Woodsmoke, 2005.

5.1.2. Concentraciones de partículas finas del humo de leña. En las cocinas tradicionales de los países en desarrollo, las concentraciones de las partículas superan los niveles permitidos, por ejemplo, los niveles de PM10 durante la preparación de alimentos pueden llegar hasta las 30,000 microgramos/m³; mientras que los valores permitidos van de 300 a 3000 microgramos/m³ en 24 horas (Albalak *et al*, 1999). Para el caso del monóxido de carbono, en los hogares que usan biomasa para cocinar se reportan valores entre 2 a 50 ppm en 24 horas, y los valores para el periodo de la cocción de alimentos se ubica entre 5 y 500 ppm. La EPA reporta valores de 9 ppm o 10mg/m³ en ocho horas (USEPA, 1997). El transporte sobre centenares de kilómetros de este tipo de partículas de combustión de biomasa ya ha sido extensamente documentado (Andrae *et al*, 1988), las inmensas nubes contienen elevadas concentraciones de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), ozono (O₃), y el óxido nítrico (NO). Durante el transporte de estos compuestos, muchas de las especies gaseosas son convertidas a otros gases o a otro tipo de partículas (Venkataraman *et al*, 2005; Koch y Hansen, 2005).

5.2 MONITOREO BIOLÓGICO

El monitoreo biológico es una metodología especialmente interesante para la evaluación de la exposición a agentes potencialmente cancerígenos. Entre todos los ensayos biológicos a corto plazo, las técnicas citogenéticas, permiten detectar lesiones en los cromosomas de linfocitos de sangre periférica, basándose en el principio que el grado de lesión genética en tejidos blanco (en este caso, linfocitos de sangre periférica), refleja lo que ocurre en las células verdaderamente importantes en el potencial desarrollo de un proceso cancerígeno (Solans y Hernández, 2007).

Si el objetivo es hacer monitoreo de personas expuestas para evaluar daño genético en las células somáticas, se pueden aplicar diferentes ensayos: (1) los micronúcleos, (2) las alteraciones cromosómicas, en sus versiones más clásicas como la búsqueda de gaps, fracturas y cromosomas dicéntricos en cultivos convencionales, así como intercambio de cromátidas hermanas o (3) en la aplicación de métodos de citogenética molecular para buscar inversiones, translocaciones, o para identificar el origen cromosómico de los micronúcleos. Todos estos se consideran marcadores de efecto temprano, lo cual significa que permiten detectar un nivel de daño que todavía es reversible (Bonassi y Au, 2002).

El empleo de marcadores biológicos en los estudios de monitoreo de poblaciones expuestas, como las ACs, puede ayudar a fortalecer las estrategias de prevención, al permitir identificar de manera temprana, poblaciones en riesgo de padecer diferentes enfermedades (Au, 2001). Para implementar estas estrategias es necesario conducir estudios en poblaciones humanas expuestas a factores ambientales para evaluar cómo las condiciones específicas individuales y genéticas modifican el riesgo y de esta manera implementar estrategias preventivas particulares a cada población.

5.3. BIOMARCADOR

Los biomarcadores se definen como cualquier molécula o estructura que puede ser medida en un individuo, usualmente por técnicas no invasivas (Collins, 1998). Un biomarcador de dosis interna toma en consideración las diferencias individuales en cuanto a la absorción, metabolismo, bioacumulación o excreción del compuesto en cuestión e indica el nivel actual del compuesto dentro del cuerpo y en tejidos específicos. El biomarcador de dosis biológica efectiva que mide la cantidad de un compuesto que ha reaccionado con macromoléculas celulares críticas, usualmente ADN o sustitutos como proteínas específicas en la sangre (Perera y Weinstein, 2000). Los marcadores de efectos biológicos tempranos nos indican la presencia y la magnitud de una respuesta biológica a la exposición a un agente ambiental. Los biomarcadores de susceptibilidad que pueden ser heredados o adquiridos, nos indican una sensibilidad elevada inusual de los efectos de una exposición ambiental en un organismo (Groopman *et al*, 1995).

5.4 LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Los linfocitos de sangre periférica (LSP) son ideales para identificar las alteraciones cromosómicas (AC) provocadas por agentes químicos, físicos o biológicos porque presentan una serie de características como: a. Disponibilidad fácil y en gran número (1ml de sangre contiene de 1 a 3 millones de linfocitos). b. Crecimiento en cultivo fácil tras ser estimulados con un mitógeno (normalmente fitohemaglutinina). Los linfocitos T son los primeros en ser estimulados a entrar en mitosis. c. Poseen una amplia distribución en el organismo. Los linfocitos T no están permanentemente circulando, sino que hay una recirculación entre la sangre y los tejidos extravasculares. d. Los linfocitos circulantes, normalmente, se encuentran en fase de no división (G0). Al cultivarlos en presencia del mitógeno se estimula la división mitótica, lo que permite el estudio de los cromosomas en metafase. e. Los linfocitos tienen una vida media de unos cuatro años, aunque se pueden encontrar linfocitos que pueden sobrevivir durante varias décadas. Esta propiedad es interesante, junto con el hecho de hallarse en fase de no división en el torrente circulatorio, porque permite detectar efectos clastogénicos transcurridos algún tiempo desde la exposición, ya que las lesiones en el ADN persisten. (Au, 2001). Los linfocitos pueden acumular lesiones debidas a la exposición repetida o prolongada, lo cual los convierte en, teóricamente, un tipo celular ideal para detectar daños debidos a exposiciones crónicas y a bajas dosis de agentes genotóxicos (Solans y Hernández, 2007).

5.5 ÍNDICE MITÓTICO (IM)

Permite calcular el porcentaje de células en división celular respecto al número total de células contabilizadas. Un aumento en el Índice Mitótico (IM) indica un posible efecto sobre el control de la división celular que conlleva a una aceleración del ciclo, el cual puede ser inducido por un agente mitógeno; y la disminución del Índice Mitótico indica un bloqueo en el ciclo, ocasionado por un posible daño en los mecanismos de la mitosis o muerte celular. El blanco molecular de los agentes con actividad antimitótica son los microtúbulos (Correia y Lobert, 2001), que

son requeridos para la migración de los cromosomas en la cariocinesis y al parecer la actividad citotóxica puede deberse a las diferentes susceptibilidades de los sistemas celulares en relación a la concentración de las sustancias citotóxicas (Ospina *et al*, 2008). El IM se calcula por la fórmula según Rojas *et al*, (1993) $IM = (\text{No de células en división celular} / \text{total de células analizadas}) \times 100$.

El ciclo celular es el mecanismo universal de reproducción de las células eucariontes, cuyo evento principal es la reproducción del número de cromosomas, siendo la mitosis el mecanismo de división de los cromosomas, del núcleo y de toda la célula. En promedio el ciclo celular de las células de mamíferos gasta entre 18-24 horas. El ciclo celular completo (regular) del organismo en crecimiento comprende dos etapas: la interfase (prolongada) y la mitosis (más breve: de 1/7 a 1/10 de todo el ciclo celular), que consta de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la interfase es posible observar un período S (síntesis) y dos periodos G₀, G₁ (anterior a S) y G₂ (posterior a S). Durante el periodo comprendido entre la telofase y la fase S, los núcleos presentan la cantidad de material genético propio de la especie (2n). Durante la fase S esta cantidad aumenta paulatinamente y a partir del período G₂ hasta la siguiente telofase es el doble. Sin embargo, el ciclo celular no siempre termina con la división celular. Los periodos G₁ y G₂ no son sólo espacios de transición al período S y a la mitosis, sino también son espacios de decisión sobre si la célula continúa o no en el ciclo de la división o si se separa temporalmente o definitivamente de él (Talledo y Escobar, 2000). El número y morfología de los cromosomas de los organismos eucariontes se estudian con mayor facilidad durante la metafase mitótica. Sin embargo, ésta es sólo una etapa por lo general bastante breve del ciclo celular.

5.6 PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

La evidencia disponible de Alteraciones cromosómicas (ACs) es muy abundante y la posible asociación con el riesgo de cáncer de este biomarcador es tema tradicional de investigación (Bonassi, 1999). La frecuencia de ACs en linfocitos de sangre periférica ha sido aplicada por décadas como un biomarcador de efecto temprano de carcinógenos genotóxicos, tanto en el escenario ambiental como ocupacional (Norppa, 2004; Bonassi *et al*, 2005; Norppa *et al*, 2006). Los estudios prospectivos de las cohortes Europea, Nórdica, Italiana, Taiwanesa y Checa, por medio de la acumulación de muchos análisis de laboratorio, han confirmado la potencial asociación entre la frecuencia de ACs y el riesgo incrementado de cáncer, lo cual no ocurre con Intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) o Micronúcleos (MN) (Bonassi *et al*, 1995; Hagmar *et al*, 1998; Bonassi *et al*, 2000; Smerhovsky *et al*, 2002; Bonassi *et al*, 2004; Rossner *et al*, 2005). De acuerdo con Hagmar *et al*, (2004) “no hay ningún otro biomarcador de cáncer que sea aplicado en sujetos saludables de una población en general con tan alta proporción atribuible”.

Si bien los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies (debido a las modificaciones que producen en el número o el ordenamiento de los genes), pueden originar también considerables repercusiones fenotípicas en el organismo o en la descendencia, tales como retardo mental, malformaciones

congénitas, infertilidad y cáncer como se observa en la especie humana. La mayoría de los agentes mutagénicos y carcinogénicos producen ACs y el ADN es el blanco principal para la acción de la mayoría de los agentes que producen fracturas cromosómicas. Las ACs pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a si el número total de cromosomas difiere de la dotación cromosómica diploide (anomalías numéricas) o bien la morfología normal de uno o más cromosomas ha sido afectada (anomalías estructurales).

5.6.1. Alteraciones cromosómicas numéricas. Las ACs numéricas se refieren a cambios en el número normal de cromosomas. Cuando la alteración numérica no se corresponde con un número entero de veces la cifra haploide de cromosomas (ej. 23 cromosomas en la especie humana), las células se denominan aneuploides. Por el contrario, cuando el número total de cromosomas corresponde a un número entero de veces la cifra haploide, se habla de dotaciones cromosómicas euploides. El principal mecanismo por el cual se originan las células aneuploides es la no disyunción, que constituye un error en la segregación cromosómica (Mateuca *et al*, 2006).

5.6.2. Alteraciones cromosómicas estructurales. Para comprender en forma adecuada el mecanismo de origen de los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas estructurales es necesario tener en cuenta el momento del ciclo celular en que se produce el daño genético. Las alteraciones en los cromosomas que surgen durante el período G1 de la interfase, o sea cuando el cromosoma aún no ha sido replicado se denominan alteraciones tipo cromosómico. Se denominan, en cambio, alteraciones de tipo cromatídico a aquellas que se producen en cromosomas ya replicados, es decir que se encuentran en el período G2 del ciclo celular (IAEA, 1986).

5.6.2.1. Alteraciones tipo cromosómico. a) *Discontinuidades:* deleción terminal o fractura cromosómica se origina por la producción de una fractura en un brazo cromosómico. Esta lesión inicial se amplifica como consecuencia del proceso de replicación del ADN (fase S) y en la mitosis subsiguiente se observa un cromosoma duplicado de tamaño inferior al normal y un fragmento acéntrico doble. Lesión acromática o “gap”, corresponde a una región cromosómica que posee escasa coloración y que ocasionalmente puede ser confundida con una fractura cromosómica. b) *Intracambios interbraquial:* cromosomas en anillo o anulares, se originan por un proceso de doble fractura que involucra ambos brazos del cromosoma. A nivel mitótico se observa un anular duplicado y un fragmento doble. c) *Intracambios intrabraquial:* deleción intersticial, se produce por la aparición de una doble lesión en un mismo brazo cromosómico con posterior eliminación del segmento intercalar y reasociación de los extremos proximal y distal del cromosoma. d) *Intercambios:* cromosomas dicéntricos, poseen dos centrómeros y se originan por la recombinación de dos cromosomas que han sufrido una fractura cada uno.

5.6.2.2. Alteraciones tipo cromatídico. a) *Discontinuidades:* lesión acromática o “gap”, corresponde a una región de cromátida que posee escasa coloración y que ocasionalmente puede ser confundida con una fractura de cromátida. Deleción simple de cromátida o fractura de cromátida, se origina por la producción de una fractura en una sola cromátida generando un fragmento acéntrico. Fractura de isocromátida, es la fractura simultánea de ambas cromátidas

b) *Intracambios interbraquial*: anillo de cromátida, se originan por un proceso de doble fractura de cromátida que involucra ambos brazos del cromosoma. Se produce luego la reasociación de los extremos proximales con formación de un anillo y, por otro generalmente, la reunión de los extremos distales. c) *Intracambios intrabraquial*: deleción intersticial de cromátida- se producen dos fracturas en el mismo brazo de una cromátida y el segmento intercalar se transforma asimismo en un fragmento acéntrico. d) *Intercambios*. Cuadrirradial Simétrico, la existencia de cromátidas fracturadas en dos cromosomas diferentes propicia la producción de una translocación recíproca entre cromátidas. Asimétrico, si bien las lesiones cromatídicas son similares, la forma de reasociación de los segmentos determina la formación de un cuadrirradial que contiene un dicéntrico y un fragmento acéntrico (Martínez y Folle, ----)

5.7 MECANISMO DE FORMACIÓN DE LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las ACs son cambios en el número o en la estructura normal de el cromosoma que pueden ocurrir espontáneamente o como resultado de tratamiento químico/radiación (Russell, 2002). Las ACs estructurales pueden ser inducidas por rupturas directas al ADN, por replicación en una hebra de ADN dañada, por inhibición de la síntesis de ADN y por otros mecanismos (Ej. Inhibidores de topoisomerasas) (Albertini, *et al*, 2000). La generación de ACs estructurales requiere una o varias rupturas de doble cadena, pero los mecanismos de formación de alteraciones de tipo cromosómico y cromatídico aparecen difiriendo con los mutágenos e involucra mecanismos específicos de reparación de ADN. Las rupturas de tipo cromosómico resultan de rupturas de doble cadena incompletamente reparados o no reparados principalmente generados in vivo en linfocitos G0-G1 por clastógenos independientes de la fase. Después de la síntesis del ADN y la duplicación del cromosoma, las alteraciones formadas en G0-G1 son duplicadas y las rupturas de tipo cromosómico e intercambios (ej. cromosomas dicéntricos y anillos) son observados en metafase. Las alteraciones de tipo cromatídico se sublevan predominantemente in Vitro durante la fase S de linfocitos cultivados, en respuesta a bases modificadas y rupturas de cadena sencilla inducidos in vivo por clastógenos dependientes de fase S (por ejemplo los químicos).

La supervivencia de las ACs estructurales depende del destino de las rupturas del ADN. Las rupturas pueden volverse a unir de tal manera que el cromosoma es restituido a su forma original, unirse incorrectamente o simplemente no volver a unirse. Estos dos últimos casos pueden ser observables en las preparaciones microscópicas de células en metafase (Albertini *et al*, 2000).

6. ANTECEDENTES

La ocurrencia de cáncer y otros problemas de salud como consecuencia de exposiciones ocupacionales y ambientales fue reconocido después de la comunicación de Pott Percival en 1775 sobre cáncer de piel en los deshollinadores. Sin embargo, pasó un siglo hasta que los estudios se extendieron al alquitrán de carbón y a los aceites minerales, y otros 50 años antes que los carcinógenos responsables fueran aislados en el laboratorio de Cook y sus colaboradores. A finales del siglo XIX, Volkman, Bell y Butlin informaron que muchos casos de tumores de escroto y problemas respiratorios dependían del tipo de ocupación y tiempo de exposición.

Algunos autores consideran que la contaminación interior por emisiones de humo de leña, genera un mayor riesgo a desarrollar problemas de salud como: infecciones respiratorias, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), enfermedades cardiovasculares, ataques de asma, problemas de vejiga y de piel, artritis, cataratas y cáncer del tracto aero-digestivo (Calle y Zeighami, 1984; Perez *et al*, 1999; Chen *et al*, 1990; Bruce *et al*, 2001; Mishra, 2003; Oyarzún, 2004; Kato *et al*, 2004; Pokhrel *et al*, 2005).

Resultados de varios estudios realizados en diferentes poblaciones humanas del mundo incluyendo Colombia, documentaron que la contaminación del humo de biomasa es un importante factor que contribuye en el desarrollo de enfermedades crónicas respiratorias y pulmonares en mujeres no fumadoras y que viven en áreas rurales (Dennis *et al*, 1996; Ekici *et al*, 2005; Dutt *et al*, 1996). Un estudio en Ecuador con mujeres y niños expuestos a la contaminación interior, encontró una baja función pulmonar en los niños que vivían con familias que utilizaban combustibles de biomasa para cocinar (Rinne *et al*, 2006). De la misma manera dos estudios llevados a cabo en Nepal, Zimbabwe observaron una fuerte asociación entre el número de horas diarias que reportaron las madres que los niños pasaron cerca del origen de la combustión y la incidencia de infección respiratoria alta (Pandey *et al*, 1989; Collings *et al*, 1990). Straif *et al*, (2006) calcularon que la contaminación interior causa 2.2 – 2.8 millones de muertes anuales incluyendo 1 millón de muertes debidas a problemas respiratorios agudos en niños.

Así mismo estudios en poblaciones humanas expuestas al humo de leña y de distintas regiones geográficas documentan una asociación positiva entre el factor de riesgo ambiental (combustión de biomasa) y el desarrollo de cáncer de pulmón tanto en hombres como mujeres, adultos y niños; estas poblaciones incluyen: China, Taiwán; México y Europa (Dai *et al*, 1996; Lee *et al*, 2001; Kleinerman *et al*, 2002; Lan *et al*, 2002; Hernandez-Garduno *et al*, 2004; Lissowska *et al*, 2005; Pandey *et al*, 2005).

En cuanto a la citotoxicidad y genotoxicidad por la exposición al humo de leña, Sungu *et al*, (2001) identificó un aumento significativo en la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas, en un grupo de 20 mujeres Turcas, no fumadoras saludables entre 25 -70 años expuestas entre 3-5 horas por día, por más de 10 años a la combustión de biomasa, comparado con un grupo control. Musthapa *et al*, (2004) llevaron a cabo un estudio de Micronúcleos (MN) y Alteraciones Cromosómicas (ACs) para evaluar cantidad de daño en el ADN producido por el uso de combustibles para cocinar. Los resultados indicaron efectos en la frecuencia de ACs y MN con relación a la edad y tiempo de exposición. Castillo y Trejo, (2007) llevaron a cabo un estudio para determinar *in vitro* la capacidad antígenotóxica de *spinacia oleracea* en linfocitos de sangre periférica de 50 mujeres expuestas crónicamente al humo de leña; los resultados mostraron una asociación significativa entre edad, tiempo de exposición y frecuencia de ACs donde el extracto total de *spinacia oleracea* moduló los efectos genotóxicos (Alteraciones Cromatídicas) generados por la exposición al humo de leña. Arturo Torres-Dosal *et al*, (2008) llevaron a cabo un estudio en 20 sujetos saludables de una comunidad Indígena en México usando biomarcadores de efecto y exposición (ensayo cometa, carboxihemoglobina en sangre y niveles urinarios de 1-hidroxipireno); los tres biomarcadores presentaron diferencias significativas antes y después de la intervención de un programa de reducción de riesgo en aquellas familias que usan biomasa para cocinar. De la misma manera Pandey *et al*, (2005) mediante el ensayo Cometa observó alto daño en el ADN, el cual se incrementaba en aquellas mujeres expuestas a combustibles como el estiércol y la leña, contrario a las mujeres que utilizaban combustible fósil (petróleo líquido). Sul *et al*, (2003) reportaron mediante el ensayo Cometa los efectos de la exposición a hidrocarburos aromáticos como el mayor inductor de daño sobre el ADN en trabajadores de incineración e inspección de gases. Similares resultados han sido reportados por Kato *et al*, (2004) en un estudio realizado en el Brasil en hombres expuestos al humo de leña, quienes expresaron un incremento en la mutagenicidad de metabolitos urinarios (pireno y naftaleno) resultado de la exposición al humo de leña. La Tabla 2 resume los estudios llevados a cabo en humanos expuestos a la combustión de biomasa mediante el uso de biomarcadores.

Tabla 2. Estudios que demuestran daño citogenético por exposición a combustibles de biomasa.

PAÍS	OBSERVACIONES	EXPUESTOS	BIOMARCADOR	AUTOR(S)
TURQUIA	Aumento significativo en la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas	Mujeres	ICHs	Sungu <i>et al</i> , (2001)
TURQUIA	La frecuencia de ICHs fue significativamente mas alta en el grupo expuesto agudamente al humo de leña y carbón respecto a un grupo control	Hombres y Mujeres	ICHs y carboxihemoglobina	Ozturk <i>et al</i> , (2002)
KOREA	Hidrocarburos aromáticos como el mayor inductor de daño sobre el ADN	Hombres	cometa	Sul <i>et al</i> , (2003)
INDIA	Frec AC y MN decreció en el orden: Estiércol de ganado > estiércol/leña > leña > Kerosene ≥ petróleo líquido	Mujeres	AC y MN	Musthapa <i>et al</i> , (2004)

BRASIL	Incrementó en la mutagenicidad de metabolitos urinarios (pireno y naftaleno)	Hombres	Metabolitos urinarios	Kato <i>et al</i> , (2004)
INDIA	Daño de ADN = uso biomasa > petróleo líquido	Mujeres	Cometa	Pandey <i>et al</i> , (2005)
MEXICO	Los tres biomarcadores presentaron diferencias antes y después de la intervención de un programa de reducción de riesgo	Hombres Mujeres niños	Cometa, carboxihemoglobina en sangre y niveles urinarios de 1- hidroxipireno	Arturo Torres-Dosal <i>et al</i> , (2008)

Los estudios llevados a cabo en animales también revelan información acerca de la toxicidad y mutagenicidad de los compuestos liberados durante la combustión de biomasa. Un estudio en 1982 y otro en 1984, sobre inhalación (tiempo en minutos de exposición), describieron los efectos producidos por el humo de leña como inductor de pérdida de las propiedades y cambios en la morfología celular de los pulmones de conejos, sugiriendo que las partículas de aldehídos absorbidas fueron las responsables de tales lesiones (Thorning *et al*, 1982; Fick *et al*, 1984). Wong *et al*, (1984) llegó a la conclusión, que la inhalación aguda del humo de leña en cerdos, puede alterar las funciones pulmonares, donde se requieren muchos días después de la exposición para una adecuada recuperación. Los resultados de estos estudios, concluyen que las inhalaciones del humo de leña pueden comprometer mecanismos inmunes de defensa pulmonar, disminuyendo así la resistencia a bacterias y otros patógenos. La reducción de las funciones pulmonares también ha sido previamente demostrada en perros expuestos al humo de leña (Stephenson *et al*, 1975) y en humanos víctimas de la inhalación (Garzón *et al*, 1970). Dubick *et al*, (2002) observaron que la inhalación aguda de humo de leña en ratas produce alteraciones a nivel traqueal, resultando en una pérdida de epitelio; así mismo se reportaron alteraciones en la expresión enzimática de antioxidantes. Matthew *et al*, (2001) y Tesfaigzi *et al*, (2002) llevaron a cabo estudios en ratones y ratas expuestas a humo de leña con tiempo y concentraciones variables. Los resultados mostraron que la función pulmonar, se vio afectada en los grupos altamente expuestos. Se observó inflamación crónica en la laringe del grupo de animales expuesto e incremento en el nivel de citoquinas. Un estudio en ratones realizado en China demostró que la exposición al humo de leña aumentó las tasas de cáncer de piel (Mumford *et al*, 1990).

Un número de estudios toxico-genéticos han evaluado la mutagenicidad del humo de leña y han permitido comprender el impacto de este agente ambiental. En todos los ensayos de salmonella, los extractos del humo de leña fueron mutagénicos en los sistemas bacteriales. Varios factores incluyendo condiciones de calefacción, tipo y origen de la madera y la concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos parecieron tener importancia total en la actividad mutagénica (Hytonen *et al*, 1983; Alfheim y Ramdahl, 1984; Asita *et al*, 1991).

Según Sierra-Torres *et al*, (2006) la exposición a agentes químicos puede ser un cofactor para la inducción de tumores. Las diferencias genéticas individuales en el metabolismo de estos agentes químicos pueden afectar la susceptibilidad de los individuos hacia el desarrollo de procesos tumorales y/o cancerígenos. Existen muy pocas publicaciones, en

las cuales el agente químico a investigar sea el humo de leña; Sierra-Torres *et al*, (2006) desarrolla un estudio caso-control, de un total de 91 casos con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y 92 controles sanos, en el cual el emparejamiento de frecuencias se hace por edad y el lugar del origen, y se determinan las frecuencias de los polimorfismos CYP2E1, GSTM1, y GSTT1; evalúa la asociación de estos polimorfismos solos y en combinación con el estado de exposición al humo de leña y la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH). Se evidenció que las diferencias genéticas en el metabolismo de los agentes carcinógenos del humo de leña, particularmente en el metabolismo del CYP2E1, se confiere mayor susceptibilidad en el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical. Sin embargo, existen estudios sobre el efecto de diferentes polimorfismos en algunos compuestos específicos del humo de la leña; varios autores reportaron el efecto positivo del genotipo nulo del GSTM1 en la excreción de metabolitos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Yang *et al*, 1999; Lee *et al*; 2001; Kuljukka-Rabb *et al*; 2002), mientras que el efecto del CYP1A1 no fue evidente (Yang *et al*; 2003).

7. METODOLOGIA

7.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio se realizó mediante un monitoreo genético, de tipo Cross-sectional, utilizando los biomarcadores de efecto Prueba de Alteraciones Cromosómicas e Índice Mitótico, tanto en mujeres expuestas como no expuestas al humo de leña.

7.2. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio fueron 36 mujeres expuestas al humo de leña (rango de tiempo de exposición entre 3-9 horas) y 28 mujeres referentes no expuestas al factor de riesgo, saludables, provenientes de zonas rurales aledañas al Municipio de Popayán. Las mujeres fueron seleccionadas mediante una encuesta corta para obtener información relacionada con características socio-demográficas, estilo de vida, etnicidad, edad, nivel de escolaridad, antecedentes de exposición a compuestos tóxicos, enfermedades crónicas, entre otros (ANEXO A).

7.3 ADQUISICION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA

Inicialmente se hizo una presentación oral y motivación del estudio a los habitantes y representantes de las respectivas veredas, las mujeres seleccionadas para el estudio decidieron participar voluntariamente, respondieron una versión larga de la encuesta (ANEXO B), que complementó información relevante en cuanto al diseño de la investigación y firmaron el consentimiento informado (ANEXO C). Posteriormente se les tomó una muestra de 5ml de sangre periférica a cada una de las mujeres del grupo expuesto y referente, bajo las respectivas condiciones de asepsia, por personal capacitado y con todas las normas de bioseguridad como el uso de jeringas estériles, nuevas y heparinizadas. Después de este procedimiento, se llevaron las muestras al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética y se procedió a realizar los cultivos bajo las condiciones del protocolo ya establecido para alteraciones cromosómicas.

7.4 ESTANDARIZACION DE LAS PRUEBAS CITOGENÉTICAS

La adaptación de la técnica se realizó a partir del Protocolo “Manual de citogenética: linfocitos humanos del Laboratorio de Toxicología Genética y citogenética”, de la Universidad del Cauca. Antes de tomar las muestras de las mujeres expuestas al humo de leña, en el laboratorio se realizaron tres ensayos previos con muestras sanguíneas de donadores ajenos a la investigación, para verificar la proliferación de células metafásicas y

su estado. Se realizaron tres cultivos modificando las condiciones de siembra y cosecha, en esta fase de estandarización se re definieron algunas variables cómo: número de repeticiones de los cultivos, cantidades de algunos reactivos y sustancias y tiempos de algunos procedimientos (cosecha, centrifugación de cultivos, baño maría, etc.). Finalmente de acuerdo con los resultados obtenidos se escogieron las mejores condiciones. A continuación se realiza una breve descripción a cerca de los procesos de siembra y cosecha para linfocitos de sangre periférica:

1. Prueba experimental:

Fecha: Octubre de 2007

Nº de cultivos	RPMI 16-40	mitógeno	SBF	sangre	Tiempo de incubación	Tº de incubación	Cantidad Colcemid	Tiempo Colcemid
5	4,5ml	PHA: 1ml	1ml	8 gotas	48h	37º C	0,1 ml	2h
Tiempo hipotónica KCL 0,075M	Tiempo solución Carnoy	Tiempo Tinción Giemsa						
30min	30min	7min						

2. Prueba experimental:

Fecha: Noviembre de 2007

Nº de cultivos	RPMI 16-40	mitógeno	SBF	sangre	Tiempo de incubación	Tº de incubación	Cantidad de Colcemid	Tiempo Colcemid
2	4,5ml	PHA: 1ml	1ml	8 gotas	48h	37º C	0,1 ml	2h
Tiempo hipotónica KCL 0,075M	Tiempo solución Carnoy	Tiempo Tinción Giemsa						
35 minutos	25min	7min						

3. Prueba experimental

Fecha: Enero-Febrero de 2008

Nº de cultivos	RPMI 16-40	mitógeno	SBF	sangre	Tiempo de incubación	Tº de incubación	Cantidad de Colcemid	Tiempo Colcemid
4	4,5ml	PHA: 1ml	1ml	9 gotas	48h	37º C	0,1 ml	2h 15-20min
Tiempo hipotónica KCL 0,075M	Tiempo solución Carnoy	Tiempo Tinción Giemsa						
40 minutos	20min	8min						

7.5 CULTIVO Y COSECHA DE LINFOCITOS

Utilizando el protocolo de alteraciones cromosómicas y en condiciones máximas de esterilidad en la cámara de flujo laminar, se realizó un cultivo de linfocitos con su respectiva repetición para cada una de las participantes del estudio. Cada tubo de cultivo contuvo 4.5 mL de medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina y antibiótico (penicilina 100 U y estreptomicina 100µg/mL) (Au, 1991); posteriormente se adicionaron 0.5 mL de sangre y 0,1 mL de fitohemaglutinina, y la mezcla se incubó a 37°C. Los cultivos se trataron con Colcemid a una concentración final de 0,1 mg/mL, a fin de bloquear la acción del huso mitótico y obtener un buen número de células en metafase. Finalmente, los cultivos se cosecharon a las 48 horas (Figura 1), se centrifugaron las células para eliminar el medio de cultivo (800–1000 rpm/7 min), se agregó solución hipotónica (0,075 M de KCl) a 37°C durante 40 minutos en baño maría (37°C) para hinchar las células y se fijaron con solución de Carnoy (metanol y ácido acético, 3:1). Las preparaciones citológicas se hicieron con 2–3 gotas de la suspensión celular concentrada en portaobjetos limpios y mantenidos en ácido acético frío al 60%. Las placas se secaron cuidadosamente en una plancha de calor a 56°C durante 2 minutos y después de tres días se colorearon mediante tinción con Giemsa al 10% durante 8 minutos. Posteriormente, las placas se montaron con Entellan, se codificaron y se sometieron a un doble emascaramiento para evitar sesgos durante su evaluación (Hoyos *et al*, 2002).

Figura 1. Protocolo para cultivo de linfocitos humanos aplicado para prueba de citotoxicidad Índice Mitótico y Alteraciones Cromosómicas.



Fuente: propia

Para determinar el índice mitótico se cuantificaron 1000 células por cultivo contando las células en división y distinguiéndolas de las que estén en interfase, para un total de 2000 células por paciente. El IM se reportó como la frecuencia de células en metafase en 2000 linfocitos. Para el análisis de las ACs, las placas se observaron bajo el microscopio óptico a un aumento de 100X. Se analizaron 100 células en metafase completa -teñidas con colorante giemsa ($2n \geq 46$ cromosomas)- por persona. Según Whorton, (1981) se deben analizar por lo menos 100 células para cada persona y así detectar un incremento en la

frecuencia de alteraciones cromosómicas en el grupo expuesto que doble la frecuencia basal de 0.02 en el grupo control. De cada persona se hicieron dos cultivos y de cada cultivo se hicieron dos placas. Se contabilizaron las ACs de tipo estructural (rupturas cromatídicas, cromosómicas o ambas) y numérico (cambio en el número de cromosomas) sin especificar el par o grupo de cromosomas en el que se detecte la alteración.

7.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para obtener la población objeto de estudio, se tuvieron en cuenta algunos criterios de inclusión y de exclusión que influyen con los resultados.

7.6.1. Criterios de inclusión. Mujeres saludables, con mínimo 10 años de exposición al humo de leña. Para el grupo referente, mujeres no expuestas al humo de leña como mínimo los últimos 8 años de vida. Tanto el grupo expuesto como el referente fueron personas Caucanas y saludables, en un rango de edad comprendida entre 20-75 años.

7.6.2. Criterios de Exclusión. Personas fumadoras, consumo frecuente de alcohol, ser dependiente de alguna droga o medicamento, estar expuestas a plaguicidas, presentar síntomas de enfermedades respiratorias o enfermedades infecciosas (Hepatitis o VIH) y enfermedades autoinmunes como deficiencia inmune pulmonar, anemia hemolítica, lupus, artritis reumatoide, tiroiditis, esclerosis múltiple (las cuales no se pudieron tener en cuenta debido a las condiciones socio-económicas y de escolaridad de la población objeto de estudio) y enfermedades inmunodeficientes (asma, diabetes). No haber sido irradiadas en un lapso mínimo de 1 año y que no tengan antecedentes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón o de otros tipos de tumores.

Las mujeres expuestas y las referentes se aparearon con base a edad, estrato socioeconómico y procedencia. El apareamiento no se hizo de forma individual, sino con base a frecuencias.

Para comparar a los grupos de mujeres expuestas y no expuestas, para las variables cualitativas, se usaron tablas de contingencia y se aplicaron las pruebas de Chi-cuadrado, Estadístico exacto de Fisher. Para las variables cuantitativas se usó la prueba U de Mann-Whitney.

Para evaluar el efecto citotóxico en el grupo de mujeres expuesta y en el grupo referente, el Índice Mitótico se halló analizando 2000 células por cultivo, y el IM se calculó mediante la fórmula: $(N^{\circ} \text{ de células en metafase} / N^{\circ} \text{ total de células}) \times 100$. Los grupos (expuesto y no expuesto) se compararon respecto al IM, con la prueba de significancia estadística, no paramétrica U de Mann-Whitney.

El N° de ACs promedio fue identificado en 100 células (ACs / 100 células). El registro de el dato se reportó en un cuadro (Anexo D), para finalmente comparar los promedios de las Alteraciones Cromosómicas de ambos grupos. A los datos obtenidos se les aplicó estadística descriptiva (Media \pm error estándar) y se sometieron a prueba de significancia estadística de carácter no paramétrico (Prueba de Mann-Whitney) al no cumplir con los requisitos de homogeneidad de varianza y normalidad. Se efectuó análisis de correlación lineal mediante las pruebas de Pearson y Rho de Spearman entre Alteraciones Cromosómicas, Índice Mitótico y las variables independientes cuantitativas (edad y exposición al humo de leña). Este análisis se complementó con prueba de regresión y curva de mejor ajuste. Para determinar significancia estadística en el IM y la frecuencia de ACs vs los factores particulares de la población expuesta al humo de leña (“ventilación de la casa”, “ubicación del recinto” y “exposición diaria”) se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Todos los datos y comparaciones estadísticas fueron realizados mediante el software SPSS 11.5 a un nivel de significancia máximo de 0.05.

7.6.3. Tipo de variables

V A R I A B L E S	Independiente	Exposición al humo de leña (grupo expuesto)
	Dependiente	Índice Mitótico Frecuencia de Alteraciones Cromosómicas
Factores	Edad Nivel de educación Consumo de vegetales Antecedentes familiares con cáncer Antecedentes familiares con malformaciones Ex fumador Consumo de bebidas alcohólicas Ventilación del lugar donde cocina* Ubicación del recinto donde cocina* Exposición diaria al humo de leña*	
Niveles del factor	(3) Edad (3) Nivel de educación: primaria – secundaria - universitaria (3) Consumo de vegetales: Nunca- Consume poco -No consume (2) Antecedentes familiares con cáncer: Si - No (2) Antecedentes familiares con malformaciones: Si – No (2) Ex -fumador: Si - No (2) Consumo de alcohol: Si- No (2) Ventilación del lugar donde cocina: Si - No (2) Ubicación del recinto donde cocina: Fuera – Dentro (2) Exposición diaria al humo de leña: Medio día – todo el día	
Tipo de investigación	<i>Cross- sectional</i>	
Tipo de experimento	Comparativo o prueba de hipótesis	

*: Factor exclusivo para grupo de mujeres expuestas al humo de leña.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACION OBJETO DE ESTUDIO

En la tabla 3, se reportan las características sociodemográficas de los grupos estudiados. El grupo expuesto al humo de leña, conformado por 36 mujeres tuvo un promedio de $42,50 \pm 17,23$ años de exposición y una edad promedio de $43,06 \pm 2,85$ años. El grupo referente, conformado por 28 mujeres, no expuestas ambientalmente al humo de leña por lo menos los últimos 8 años de vida, tuvieron una edad promedio de $43,29 \pm 2,20$ años. Respecto a las características sociodemográficas analizadas, no se halló diferencia significativa entre los grupos para variables como: “antecedentes familiares con malformaciones”, “ex-fumadores”, “antecedente familiares de cáncer” y “frecuencia en el consumo de vegetales”, indicando eficacia en el apareamiento de expuestos y referentes. La única variable que presentó disparidad entre los dos grupos fue “nivel de educación”, con una significancia de 0,017. Esta variable se tuvo en cuenta al analizar la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (ACs) e Índice Mitótico (IM) entre los grupos, pues podía convertirse en un factor de confusión debido a que la única diferencia que se busca que haya entre las variables de estudio, es la diferencia correspondiente al factor de exposición, evitando así que otro tipo de variables (independientes) puedan tener alguna influencia en la variable dependiente y finalmente se pueda predecir que la influencia se debe a la variable objeto de estudio (factor exposición) y no a la variable que presenta diferencia entre los grupos. Razón por la cual se debe incluir en el análisis para descartar la influencia en las ACs y el IM.

Tabla 3. Características sociodemográficas de la población de estudio.

Variable	Expuestos n (%)	Referentes n (%)	p
Sujetos	36	28	
Edad (años)			
Media ± Error Estándar	43,06 ± 2,85	43,29 ± 2,20	0,750 ^c
Tiempo de Exposición (años)*			
Media ± Error Estándar	42,50 ± 17,23	-	NC
Antecedentes Familiares con Malformaciones			
Si	33 (91,6)	27 (96,4)	0,625 ^b
No	3 (8,3)	1 (3,5)	
Ex-Fumador			
Si	4 (11,1)	3 (10,7)	1,000 ^b
No	32 (88,8)	25 (89,2)	
Nivel de Educación			
Primaria	33 (91,6)	18 (64,2)	0,017 ^a
Secundaria	3 (8,3)	7 (25,0)	
Universitaria	0 (0)	3 (10,7)	
Antecedentes familiares con Cáncer			
Si	10 (2,7)	6 (21,4)	0,772 ^b
No	26 (72,2)	22 (78,5)	
Consumo de bebidas Alcohólicas			
Nunca	29 (80,5)	24 (85,7)	0,447 ^a
Dos a cuatro veces/año	5 (13,8)	4 (14,2)	
Una a dos veces/mes	2 (5,5)	0 (0,0)	
Ventilación Lugar donde cocina			
Si	27 (75)	-	NC
No	9 (25)	-	NC
Ubicación recinto donde cocina			
Fuera de la casa	28 (77,8)	-	NC
Dentro de la casa	8 (22,2)	-	NC
Exposición Diaria al humo de leña			
Medio día	13 (36,1)	-	NC
Todo el día	8 (22,2)	-	NC
Consumo Vegetales (semana)			
No Consume	2 (5,5)	2 (7,1)	0,535 ^a
Consume Poco	23 (63,8)	14 (50,0)	
Consume	11 (30,5)	12 (42,8)	

n = tamaño de muestra; N^o promedio con su respectivo error

p: significancia estadística: ^a Prueba de Chi-cuadrado; ^b Estadístico exacto de Fisher; ^c Prueba de Mann-Whitney

NC: no computable

* Variable exclusiva para el grupo expuesto

8.2 EFECTO CITOTÓXICO POR EXPOSICION AL HUMO DE LEÑA

Los resultados del análisis de Índice Mitótico en mujeres expuestas al humo de leña y no expuestas se presentan en la Tabla 4. La media y desviación estándar fue $5,14 \pm 0,406\%$ para el grupo expuesto y $6,66 \pm 0,410\%$ para el grupo referente. El análisis estadístico mostró una asociación estadísticamente significativa $p < 0,05$, es decir que el IM se vio afectado por el factor de exposición (Fig. 2). Esta relación permite afirmar que la velocidad de división celular se vio inhibida en alguna de las fases G1, S o G2 del ciclo, ya que la célula, al estar expuesta a los distintos compuestos químicos genotóxicos presentes en el humo, intenta reparar los daños deteniéndose en los principales puntos de chequeo, disminuyendo el número de células que pasan a mitosis. Estudios de citotoxicidad donde se evalúa el Índice Mitótico de sustancias químicas con testigos negativos y a distintas concentraciones, permiten aseverar los resultados obtenidos en el presente estudio (Roldan y Beltrán --; Madrigal-Bujaidar *et al*, 2002). D'Arce *et al*, (2000) llevaron a cabo un estudio de monitoreo citogenético en un grupo de 20 trabajadores expuestos ocupacionalmente a plaguicidas en Brasil. El Índice mitótico de los controles fue significativamente más alto que el grupo de individuos expuestos y estuvo asociado con la edad de los individuos. Ergene *et al*, (2007) también reportó una disminución significativa ($p < 0,01$) en el IM cuando se tomaron muestras de mucosa bucal en un grupo expuesto a mezclas complejas de pesticidas y un grupo control ($n=32$). Bahia *et al*, (2004) encontraron que las células de personas con niveles exposición relativamente altos a mercurio, presentaron una disminución del índice mitótico y un incremento en la frecuencia de las células poliploides, indicando que el IM es un indicador útil citogenético de personas expuestas a sustancias tóxicas, pero sobre todo es un biomarcador de gran utilidad en poblaciones de áreas remotas donde es muy difícil aplicar otro tipo de pruebas más sofisticadas. Tal sensibilidad a la exposición al mercurio, expresada en el descenso del IM, se explica porque el mercurio se puede unir fácilmente a los puentes SH- de la tubulina, y de esta manera se inhibe el ensamble de los microtúbulos. Esta unión causa daños en la función del huso, que actúa como un mecanismo de citotoxicidad al inhibir el crecimiento celular (Graf y Reuhl, 1996). Calderón-Segura *et al*, (2004) evaluaron el efecto genotóxico, propiedades citocinéticas y citotóxicas de partículas suspendidas en el aire en la Ciudad de México, y pudieron determinar que el IM decrecía constantemente con el incremento de la concentración de extractos del material orgánico, los cuales provienen de partículas (PM10) suspendidas en el aire. La cinética de proliferación celular fue afectada, pues a medida que el material orgánico se incrementaba, las células en M2 y M3 fueron decreciendo, mientras que las células en M1 fueron más frecuentes; el índice de replicación y el IM también disminuyeron significativamente en relación con el aumento de la concentración. En todos los casos el efecto de exposición fue dosis-dependiente. Sugiriendo que el retraso en el ciclo celular, se debió a los nitro-HAPs y a los productos metabólicos in vitro de los HAPs, los cuales interfirieron con la regulación del ciclo celular e inhibieron el proceso de mitosis. Según Galloway, (2000) la citotoxicidad de químicos mutágenos puede ser estimada por varios biomarcadores y uno de los más usado es el IM, y cuando se usa cultivo de linfocitos, el empleo del IM es una medida de toxicidad aceptable, especialmente cuando otras medidas de toxicidad son engorrosas o poco prácticas (Galloway *et al*, 1994).

Estas observaciones se suman a la investigación actual, dado que los nitro-HAPs son compuestos que están presentes en el humo de leña, producto de la pirólisis de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno (Mastandrea *et al*, 2005), es de gran importancia tratar de entender el efecto citotóxico sobre los linfocitos de las mujeres expuestas. Los nitro-HAPs son conocidos por estar formados en la atmosfera de los PAHs, probablemente por la nitrosación del O₃ y NO₂ (reacciones del oxido de nitrógeno y los radicales libres) (Finlayson-Pitts y Pitts, 1997). Uno de los más abundantes nitro-HAPs presentes en ambientes interiores, es el 1-nitropireno. El cual ha sido considerado como un buen marcador de acción directa de mutagenicidad (Rosenkranz y Mermelstein, 1983; Wasserkort *et al*, 1998; Hayakawa *et al*, 1995). En adición, los estudios indican que los HAPs, al formar aductos con el ADN, conducen a disturbios con la mitosis y la muerte celular (Barbisan *et al*, 1999). El índice mitótico disminuye cuando la concentración del material particulado y en consecuencia de los nitro-HAPs, aumenta significativamente. Sin embargo, aunque es posible que sólo algunos compuestos sean el factor principal involucrado, es probable que los efectos letales genéticos y celulares descritos sean causados por una mezcla de compuestos en el material particulado. Cada vez hay más pruebas que sugieren que estas mezclas ambientales no son sólo complejas, si no que su efecto también puede ser imprevisible y complejo, pues algunas combinaciones pueden tener efectos aditivos, sinérgicos, potencializadores, o antagonistas (McGowen, *et al*, 2000).

Probablemente al formarse el aducto, una base equivocada se une al ADN, por ende en el momento de síntesis, la respuesta por parte de la célula ante los efectos genotóxicos, es el bloqueo de la replicación y la activación de los mecanismos de reparación; Por ejemplo, el gen supresor de tumores P53, involucrado con la regulación del ciclo celular en los puntos de transición G1/S y G2/M, por un lado, puede detener el sistema de control en G1 y por lo tanto impide la posterior entrada en mitosis (efecto inhibitorio de la P21 al unirse al complejo ciclina-Cdk2) o actúa a través de la señalización de procesos apoptóticos en los casos en los que la reparación del daño genotóxico inducido no pueda ser reparado (activando Bax e IGFBP3 o inhibiendo Bcl2 por unión a las zonas promotoras de estos genes) (Hernández y Ríos, 2001), de tal manera que la lesión primaria no se convierta en mutación.

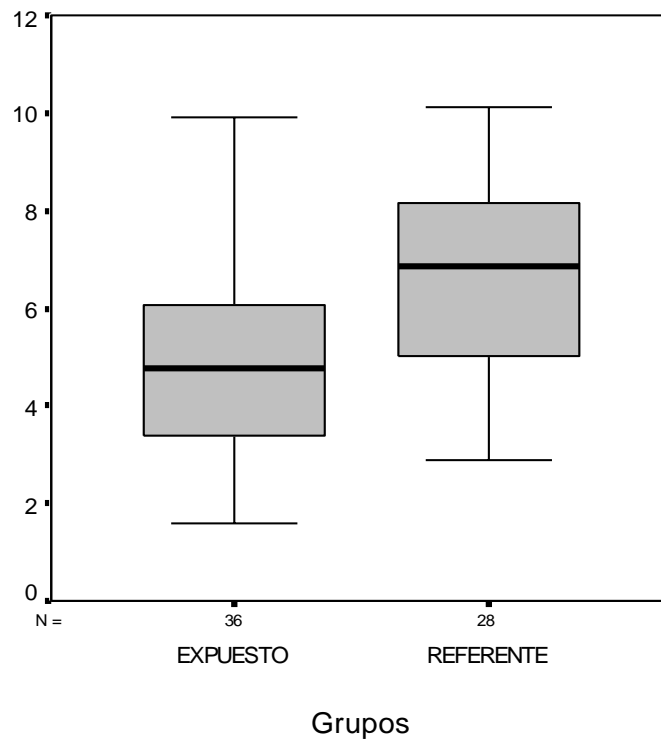
También los HAPs y sus nitroderivados no son mutagénicos/cancerígenos directos, sino que necesitan sufrir una activación metabólica previa para tornarse capaces de reaccionar con el ADN otras macromoléculas. Es probable que el ataque electrofílico del ADN por los epóxidos ocurra por medio de un mecanismo de tipo SN1 que es un proceso a través de estados de transición en los cuales el hidrocarburo exhibe un importante carácter de ión carbonio. Así, la reactividad con el ADN, y consecuentemente la capacidad carcinogénica de estos compuestos, estaría directamente relacionada con la capacidad de formar estos iones (Harvey *et al*, 1994). Generalmente el metabolismo de los nitro-HAPs consiste en la activación del anillo o N-oxidación, dando como resultado la producción de la formación de aductos e intermediarios mutagénicos. Estos compuestos pueden alcanzar los pulmones, donde pueden ser reducidos metabólicamente u oxidados a especies reactivas de oxígeno, capaces de unirse al ADN y a otras macromoléculas biológicas (Talaska, *et al*, 1996).

Tabla 4. Efecto de la exposición crónica al humo de leña en el Índice Mitótico y la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas.

Variables	Índice Mitótico	Alteraciones Cromosómicas		
		Rupturas Cromatídicas	Rupturas Cromosómicas	Rupturas Totales
Grupo:				
Expuesto Media ± EE	5,14 ± 0,406	2,94 ± 0,245	0,17 ± 0,063	3,11 ± 0,248
Referente Media ± EE	6,66 ± 0,410	1,43 ± 0,202	0,29 ± 0,101	1,71 ± 0,217
<i>p</i>	0,009 ^c	0,000 ^c	0,383 ^c	0,000 ^c

p: significancia estadística; ^c Prueba de Mann-Whitney

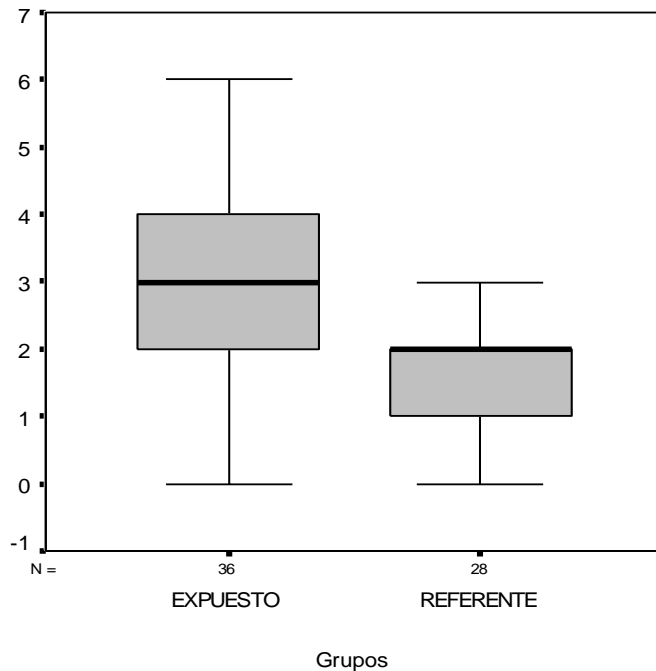
Figura 2. Efecto de la exposición al humo de leña en el Índice Mitótico.



8.3 EFECTO GENOTOXICO POR EXPOSICION AL HUMO DE LEÑA

La Tabla 4, muestra el número promedio de rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas y total de alteraciones cromosómicas (ACs), registradas en 100 células por paciente, en los grupos expuesto y referente, donde se incluye el nivel de significancia o probabilidad de error tipo I (p). Se observó que el número promedio de ACs totales ($3,11 \pm 0,248/100$ células), fue significativamente mayor ($p=0,000$) en el grupo de mujeres expuestas al humo de leña respecto a las referentes ($1,71 \pm 0,217/100$ células). El resultado del estudio detectó una actividad genotóxica de los químicos presentes en el humo de leña (Fig. 3). Estudios de biomonitoreo con ACs han podido determinar daños genéticos en linfocitos no reparados y acumulados durante varios años de exposición crónica a dosis relativamente bajas de diferentes clases de químicos, expresados luego de atravesar una primera división celular *in vitro*, en un incremento de la frecuencia de daño cromosómico (Hoyos, 2006). Estos resultados permiten ratificar estudios previos de biomonitoreo con biomarcadores citogenéticos (Mn, AC, ICHs) en poblaciones expuestas y no expuestas a agentes contaminantes en ambientes interiores (intradomiciliario) y exteriores (contaminación urbana) (Heepchantree *et al*, 2005; Michalska, *et al*, 1999). Por su parte, algunos informes señalan que las ACs causan directamente la muerte celular (Heddle y Salomone, 1981), por ello los cambios en el IM pueden considerarse como indicadores de daño citotóxico o citostático.

Figura 3. Asociación entre el N° de Alteraciones Cromosómicas/100 células y los grupos de estudio.



Estudios citogenéticos donde se ha evaluado el efecto genotóxico por la exposición al humo de biomasa, indican daño del ADN, expresado en un incremento en la frecuencia de MN, ICHs, ensayo cometa y metabolitos urinarios (Sungu *et al*, 2001; Sul *et al*, 2003; Kato *et al*, 2004; Pandey *et al*, 2005; Torres-Dosal *et al*, 2008). La genotoxicidad se debe a que la combustión incompleta de biomasa emite una mezcla de compuestos orgánicos y gases, como monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y sulfuro, aldehídos, HAPs, compuestos orgánicos volátiles, material particulado y radicales libres conocidos por ser agentes tóxicos y potencialmente carcinogénicos causantes de muchas enfermedades como infecciones respiratorias, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, enfermedades cardiovasculares, ataques de asma, problemas de vejiga y de piel, artritis, cataratas y cáncer (Perez *et al*, 1999; Chen *et al*, 1990; Albalak, 2001; Mishra 2003; Delgado *et al*, 2005; Bruce *et al*, 2001; Oyarzún, 2004; Kato *et al*, 2004; Ekici *et al*, 2005). Compuestos que además han demostrado ser mutagénicos (Gao *et al*, 1994, Yin *et al*, 1998) y genotóxicos en estudios *in vitro* (Brits *et al*, 2004) y en poblaciones humanas (Pandey *et al*, 2005, Ozturk *et al*, 2002).

Las emisiones de combustión de materia orgánica, generan agentes volátiles y contaminantes gaseosos del aire, los cuales contienen compuestos orgánicos que inducen toxicidad, mutagenicidad, daño genético, daño oxidativo e inflamación. Los HAPs y los hidrocarburos oxigenados aromáticos y nitrogenados relacionados (Ej., nitro- HAPs, quininas y lactonas) están presentes en todas las emisiones de combustión de leña o se forman como productos de transformación atmosférica. Se ha establecido que estos compuestos electrofílicos juegan un papel clave en el cáncer ambiental, en enfermedades cardiovasculares y efectos reproductivos adversos (Lewtas, 2007). La actividad mutagénica de las emisiones de las estufas que usan madera como combustible y la relación de la producción de HAPs, ha sido ampliamente evaluada en diferentes estudios, (Moeller *et al*, 1985; Watts *et al*, 1988; McCrillis, Watts y Warren, 1992). El primer estudio de diferentes tipos de combustibles de madera, pudo determinar que las concentraciones de HAPs están en un rango de 120 a 4000 mg/kg y que la tasa de emisiones de los HAPs aumentan con el incremento del material particulado (PM) y la disminución de la eficacia de combustión (Jenkins *et al*, 1996).

La biomasa contiene muchos agentes químicos y especies reactivas de oxígeno que pueden dañar biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN (Halliwell, 1987). Fumar cigarrillo y exponerse a la combustión de biomasa causan enfermedad crónica obstructiva pulmonar, en la cual, los radicales libres y los metabolitos reactivos de oxígeno presentan un aumento significativo (American Thoracic Society, 1995; Smith *et al*, 1983; Chen *et al*, 1990). El daño oxidativo en el ADN es el más importante debido a que puede iniciar y promover la carcinogénesis (Ames *et al*, 1995; Lindahl, 1999). Smith *et al*, (1983) y Chen *et al*, (1990) encontraron que el daño en el ADN es considerablemente más alto en fumadores y en individuos expuestos a la combustión de biomasa, en los cuales, los acontecimientos oxidativos ocurren más frecuentemente en comparación al grupo control.

Los radicales libres, al colisionar con una macromolécula, la oxida al sustraerle un electrón y provoca que pierda su función específica en la célula (Rodríguez *et al*, 2001).

Dicho daño puede causar oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos (Sánchez, *et al*, 2004; Batista, *et al*, 2006) lo que produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Dorado *et al*, 2003). Se mantiene hoy en día, la ambigüedad desatada a mediados de los 80, a cerca de si es el estrés oxidativo el causante del daño celular, o mas bien el daño celular el causante del estrés oxidativo por aumento de los radicales libres de forma secundaria, inclinándose esta ambigüedad, en la mayoría de las patologías en las que los radicales libres actúan en mayor grado, hacia la primera suposición (Orrenius *et al*, 1989; Coghlan, 1991).

Las alteraciones de ADN que más frecuentemente se observan en situaciones de estrés oxidativo son: incremento en los niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimidínicas. La oxidación al ADN produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por el daño al gen específico, que puede provocar entrecruzamiento de proteínas-ADN, ICHs, alteración a la estructura de la desoxirribosa-fosfato y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas. La oxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena sencilla en las hebras de ADN, lo que puede producir la formación de micronúcleos (Schmid, 1975). La reactividad del OH hacia la desoxirribosa varía considerablemente y los carbonos 4 y 5 resultan ser los más susceptibles (Rodríguez *et al*, 2001; Sánchez *et al*, 2004). El ADN, es considerado como el principal diana del ataque de sustancias oxidantes. Entre los agentes radicales el ión hidroxilo y el peroxido de hidrogeno (Auroma *et al*, 1989), los cuales son capaces de provocar la escisión monocatenaria o bicatenaria de la molécula de ADN, en la mayoría de los casos, por roturas simples. (Casado *et al*, 1996).

Las especies reactivas de oxígeno pueden provenir tanto de agentes endógenos como exógenos (Xenobióticos), en actual trabajo los compuestos químicos genotóxicos presentes en la combustión incompleta del humo de leña, al ser biotransformados por las enzimas metabolizantes de la fase 1 (oxidación, reducción o hidrólisis) o fase 2 (conjugación) produjeron intermediarios reactivos (radicales libres) que interactuaron con los centros nucleofílicos del ADN (Vega y florentino, 2000) debido a que los mecanismos de defensa celular se vieron alterados y se presentó una posible saturación en las rutas de biotransformación por las elevadas dosis de químicos genotóxicos. Por tal razón el elevado estrés oxidativo presente en el grupo expuesto, generó mas quiebres de cadena sencilla o quiebres de cadena doble (Houtgraaf *et al*, 2006), que en el momento de la replicación del ADN se observa en las ACs obtenidas a partir de los linfocitos de sangre periférica de las mujeres expuesta al humo de leña

Gani *et al*, (2000) reportaron que había un aumento significativo en la actividad de lípido-peroxidación y una disminución significativa en la actividad enzimática antioxidante en mujeres expuestas a combustibles de biomasa. La peroxidación lipídica se entiende como la destrucción de ácidos grasos en un incontrolable proceso que da lugar a la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos y una serie de productos secundarios, incluyendo un amplio rango de aldehídos, generada por el ataque de especies radicales con suficiente

poder oxidativo como para sustraer un átomo de hidrogeno de un metilo de la cadena del acido graso, dando lugar a un radical lipídico centrado en el carbono (Cheeseman, 1993). Conllevando a inactivar receptores y proteínas de membrana entre muchas otras acciones (Esterbauer *et al*, 1988) En el caso de las proteínas, casi todos los aminoácidos pueden ser oxidados por las especies reactivas de oxígeno, pero los aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina) son los más susceptibles (Mary *et al*, 2004). La acción de los radicales libres sobre las proteínas se ejerce sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH). Los grupos sulfhidrilo (-SH) con sus estados de oxidación +6, +4, +2 y -2, pueden ser transformados en puentes disulfuro (S=S), produciéndose la inactivación enzimática (si la proteína es una enzima) (Stadtman, 1993).

A la misma vez la actividad enzimática antioxidante de las personas expuestas se ve comprometida, es muy probable que el organismo no puede defender contra las especies reactivas debido a que los procesos endógenos no actúan correctamente, como es el caso de las enzimas antioxidantes que catalizan las desactivaciones selectivas de cada una de las ROS generadas (evitando la formación de 1O_2 y HO^* (oxígeno en singulete y radical hidroxilo) (Torres, 2002); por otro lado debido a las condiciones económicas desfavorables son personas que no tiene una alimentación basada en frutas y verduras que actuarían como agentes exógenos y de ingesta diaria que reducen o desactivan las especies reactivas de oxígeno (Serra-Baldrich y Tribó, 1991).

El presente estudio es consistente con el estudio llevado a cabo por Mustapha *et al*, (2004) donde el porcentaje de células con ACs en el grupo de mujeres control (3,10%, gas de petróleo como combustible mas limpio para cocinar), fue menor cuando se comparó con las mujeres que usaban estiércol animal (10,80%, $p<0.01$) seguido por estiércol/madera (8,17%, $p<0,05$) y madera (6,96%, $p<0,05$). Raiyani *et al*, (1993) y Balakrishnan *et al*, (2002) encontraron que la quema de estiércol produce los mas altos niveles de HAPs dentro de los hogares y que los niveles disminuyen en el orden de quema de madera, kerosén y petróleo liquido. Por su parte Mandal y Mandal, (2002) reportaron que los combustibles de biomasa generan mas altos niveles de humo y partículas respirables en el aire (PM) que el kerosén o petróleo líquido. El incremento en la frecuencia de ACs de las mujeres expuestas, puede ser el resultado de la excesiva exposición a agentes genotoxicos como los HAPs que son un grupo de compuestos de tres y cuatro anillos, formados como resultado de la combustión incompleta de biomasa. La exposición a HAPs ha sido usada ampliamente en estudios de contaminación por aire interior (en el hogar) (Naumova *et al*, 2002; Ohura *et al*, 2005). Similares resultados se han reportado en poblaciones expuestas a agentes tóxicos (HAPs) del mismo carácter mutagénico al generado por la combustión de la leña, Fucic *et al*, (2007) encontró un incremento significativo en la frecuencia de ACs de trabajadores Croatas expuestos ambiental/ocupacionalmente a distintos agentes genotoxicos (radiaciones ionizantes, formaldehído, benceno y oxido de etileno). Sherson *et al*, (1990) reportaron que trabajadores de fundición con una alta exposición a HAPs, presentaron los mas altos niveles de aductos covalentes de HAPs en relación a un grupo no expuesto. Estudios previos han reportado un incremento de ACs en personas expuestas ocupacionalmente a gasolina/diesel y escape de gases y emanaciones (Sobti y Bhardwaj, 1993; Carere *et al*,1995; Khalil, 1995; Knudsen *et al*,1999; Chitra *et al*, 2001). Warshwsky *et al*, (1995)

informó que la exposición *in vitro* de linfocitos humanos a HAPs generado por el humo de leña, incrementa significativamente la frecuencia de MN e ICHs. Sungu *et al*, (2001) y Ozturk *et al*, (2002) en Turquía, evaluaron un grupo de mujeres expuestas al humo de leña y encontraron un aumento significativo de ICHs respecto a el grupo control. Por su parte Pandey *et al*, (2005) encontraron que el uso de combustibles de biomasa para cocinar, aumenta significativamente los niveles de daño en el ADN (ensayo cometa) comparado con aquellos sujetos que usaron petróleo líquido. Sram *et al*, (2007) encontró que el benzo(a)pireno y HAPs incrementaron el número de traslocaciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de policías residentes en la ciudad de Praga cuando se analizaron las ACs por el método de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

En la Tabla 4, se puede distinguir que el grupo referente tuvo un promedio de rupturas cromatídicas ($1,43 \pm 0,202/100$ células) significativamente menor ($p=0,000$) que el grupo expuesto ($2,94 \pm 0,245/100$ células). Mientras que para las rupturas cromosómicas no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p= 0,383$). Las Alteraciones tipo cromosómico (ACSs) y las tipo cromatídico (ACTs), difieren entre si por los mecanismos como se forman cada una de ellas. Teniendo en cuenta el momento del ciclo celular en que se produce el daño genético, las rupturas cromatídicas presentaron una mayor frecuencia en este estudio, debido a que los constituyentes químicos presentes en el humo de leña, producto de la combustión incompleta, actúan como agentes clastogénicos dependientes de la fase S (Tucker *et al*, 1993; Albertini *et al*, 2000). Las células dañadas deben entrar a la fase de síntesis antes de que el daño cromosómico sea adquirido; de tal manera que la alteración cromatídica se da en la fase S/G2 (Evans *et al*, 1964; Norppa *et al*, 2006). Tales alteraciones aumentan predominantemente *in vitro* (por lesiones pre-existentes en el ADN) durante la primera estimulación post-mitogénica fase S *in vivo* (Albertini *et al*, 2000; Norppa *et al*, 2006). Por el contrario las ACSs comúnmente se generan en los linfocitos *in vivo* en G0-G1 por clastógenos independientes de fase S (Ej. radiaciones ionizantes) (Mateuca *et al*, 2006) (Fig. 4 y 5).

Figura 4. Ruptura Cromatídica en linfocitos de sangre periférica de mujer expuesta al humo de leña.

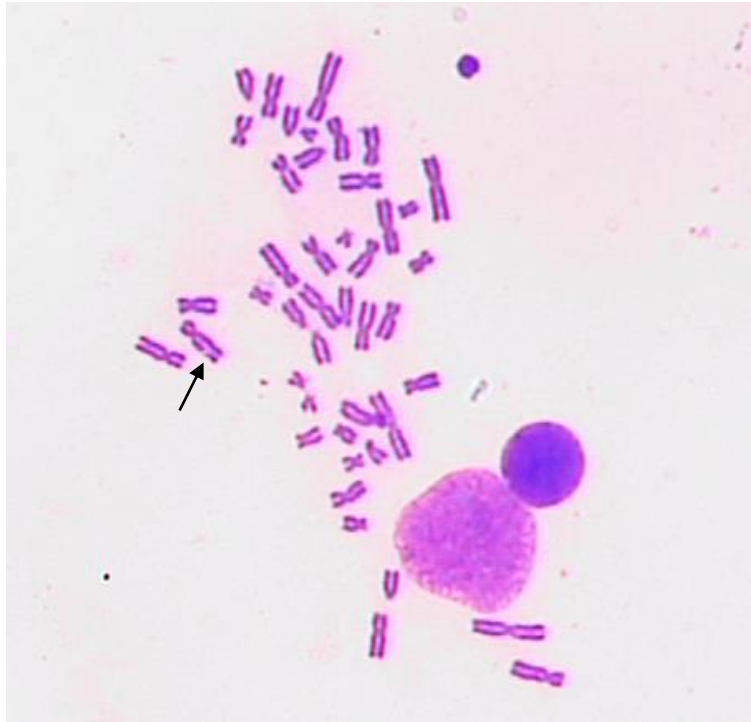
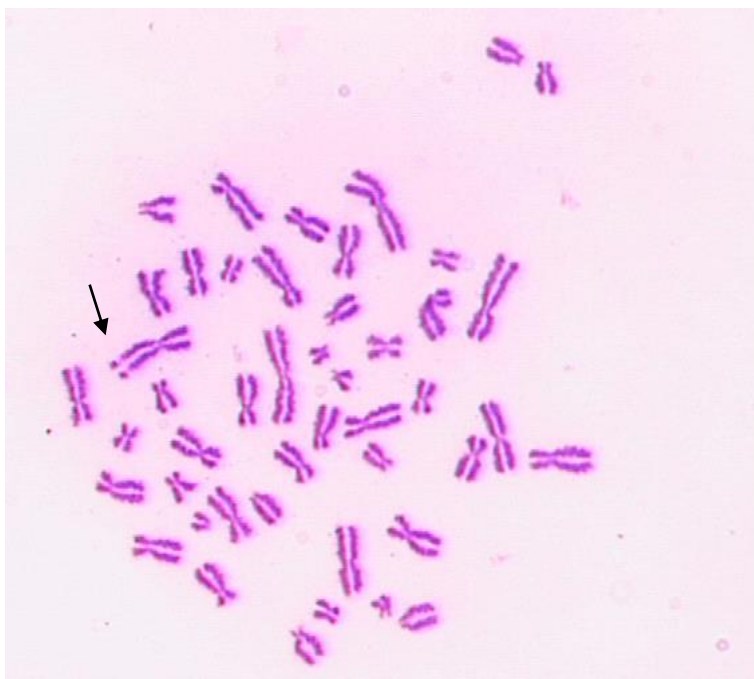


Figura 5. Ruptura Cromosómica en linfocitos de sangre periférica de mujer expuesta al humo de leña.



El efecto dañino de los residuos de sustancias genotóxicas acumuladas en las células, se expresa en forma de Alteraciones de tipo cromatídica, que se producen cuando las células pasan por la fase de síntesis en su ciclo celular (Evans *et al*, 1964). Este resultado es consistente con las ACs en linfocitos de sangre periférica de mujeres de zonas rurales, expuestas a combustibles de biomasa en México reportadas por Musthapa *et al*, (2004) las cuales fueron principalmente rupturas cromatídicas. De la misma manera Burgaz *et al*, (2002) también reportó un incremento en el nivel de rupturas cromatídicas de un grupo de policías de tránsito expuestos a altos niveles de HAPs y otros gases ambientales contaminantes. Samarth *et al*, (2006) reportó una alta frecuencia de alteraciones cromatídicas en células de médula ósea de ratones previamente expuestos a benzo(a)pireno.

8.4 EFECTO DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS (FACTORES) REGISTRADAS MEDIANTE ENCUESTA, SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

La Tabla 5, evidencia que no hubo diferencia significativa estadísticamente ($p > 0,05$) entre “consumo de vegetales”, “nivel de educación”, “antecedentes familiares con malformaciones”, “consumo de bebidas alcohólicas” y “ex fumadores” para los biomarcadores Índice Mitótico y Alteraciones Cromosómicas; sin embargo se presentó una diferencia significativa para la categoría de la variable “antecedentes familiares con cáncer” respecto de rupturas totales de Alteraciones Cromosómicas ($p = 0,027$), mientras que para el Índice Mitótico, no fue significativo ($p = 0,258$).

Tabla 5. Efecto de las variables (factores) sobre el Índice Mitótico y la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas.

Variables (n)	Índice Mitótico (%Media±EE)	Alteraciones Cromosómicas		
		Rupturas Cromatídicas (%Media±EE)	Rupturas Cromosómicas (%Media±EE)	Rupturas Totales (%Media±EE)
Nivel de educación				
Primaria (51)	5,54 ± 0,345	2,45 ± 0,208	0,15 ± 0,051	2,60 ± 0,210
Secundaria (10)	6,84 ± 0,708	1,6 ± 0,476	0,50 ± 0,224	2,1 ± 0,547
Universitaria (3)	6,85 ± 0,781	1,66 ± 0,882	0,33 ± 0,333	2,0 ± 0,577
<i>p</i>	0,202 ^d	0,228 ^d	0,156 ^d	0,432 ^d
Consumo de vegetales				
Nunca (4)	6,55 ± 1,572	2,50 ± 0,645	0,25 ± 0,250	2,75 ± 0,750
Consume poco (37)	5,57 ± 0,373	2,35 ± 0,236	0,18 ± 0,065	2,54 ± 0,231
Consume (23)	6,06 ± 0,544	2,13 ± 0,352	0,26 ± 0,113	2,39 ± 0,360
<i>p</i>	0,627 ^d	0,778 ^d	0,922 ^d	0,834 ^d
Antecedentes familiares con cáncer				
Si (16)	5,16 ± 0,519	3,06 ± 0,423	0,19 ± 0,101	3,25 ± 0,433
No (48)	6,02 ± 0,363	2,02 ± 0,196	0,23 ± 0,068	2,25 ± 0,196
<i>p</i>	0,258 ^c	0,027 ^c	0,833 ^c	0,027 ^c
Antecedentes familiares con malformación				
Si (4)	6,58 ± 1,184	3,25 ± 0,750	0,50 ± 0,500	3,75 ± 1,031
No (60)	5,75 ± 0,315	2,22 ± 0,193	0,20 ± 0,052	2,42 ± 0,188
<i>p</i>	0,477 ^c	0,196 ^c	0,758 ^c	0,186 ^c
Ex fumador				
Si (7)	5,38 ± 1,266	2,86 ± 0,595	0,43 ± 0,202	3,29 ± 0,565
No (57)	5,86 ± 0,307	2,21 ± 0,198	0,19 ± 0,058	0,40 ± 0,198
<i>p</i>	0,513 ^c	0,226 ^c	0,299 ^c	0,140 ^c
Consumo de bebidas alcohólicas				
Nunca (53)	5,88 ± 0,339	2,28 ± 0,204	0,23 ± 0,064	2,51 ± 0,204
Esporádicamente (9)	6,18 ± 0,598	1,89 ± 0,512	0,22 ± 0,147	2,11 ± 0,539
Frecuentemente (2)	2,20 ± 0,600	4,00 ± 1,000	-	4,00 ± 1,000
<i>p</i>	0,617 ^c	0,492 ^c	0,944 ^c	0,417 ^c
Edad				
20-33 (21)	6,47 ± 0,603	2,14 ± 0,333	0,24 ± 0,095	2,38 ± 0,320
36-48 (22)	5,71 ± 0,431	1,91 ± 0,236	0,27 ± 0,117	2,18 ± 0,268
50-75 (21)	5,25 ± 0,526	2,81 ± 0,382	0,14 ± 0,078	2,95 ± 0,381
<i>p</i>	0,022 ^e	0,176 ^e	0,341 ^e	0,231 ^e
Tiempo de exposición (expuesto)*				
<i>p</i>	0,027 ^e	0,162 ^e	0,588 ^e	0,121 ^e

n = Tamaño de muestra; % promedio con su respectivo error: N° promedio con su respectivo error
p = Significancia estadística: ^c Prueba de Mann-Whitney; ^d Prueba de Kruskal-Wallis; ^e Prueba de Spearman
 * Variable exclusiva para el grupo expuesto

Las ACs son una de las mas importantes consecuencias biológicas de la exposición ambiental/ ocupacional a distintos agentes genotoxicos, estudios previos han revelado que las personas con una elevada frecuencia de ACs en los linfocitos de sangre periférica

tienen un riesgo significativamente elevado de desarrollar enfermedades como el cáncer. Ese valor predictivo de las ACs, para evaluar riesgo de cáncer, fue desarrollado en Italia y en cinco países Nórdicos Europeos, en dos estudios prospectivos de cohorte de mortalidad e incidencia de cáncer, los cuales mostraron que las personas saludables con una mayor frecuencia de ACs en linfocitos humanos son predictivos de riesgo de cáncer, con una susceptibilidad 2.5 veces mayor a desarrollar cáncer, lo que no pasó con los biomarcadores de ICHs o MN (Hagmar *et al*, 1994,1998; Bonassi *et al*, 1995, 1996 y 2000; Rossner *et al*, 2005; Norppa *et al*, 2006). Sin embargo, solo hasta el 2007 se logra establecer que un incremento en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica predicen el riesgo de cáncer en humanos (Bonassi *et al*, 2007). Tal asociación, no mostró modificación con factores como edad, género, procedencia (país) o vejez. Los niveles de daño en el ADN, de todos los desordenes neoplásicos, permiten concluir que están caracterizados con anomalías cromosómicas recurrentes y específicas (Mitelman *et al*, 1997). Suministrando una fuerte evidencia de que el origen de las ACs asociadas a procesos neoplásicos tienen un rol causal en la carcinogenesis. El mecanismo involucrado es desconocido, pero una ruptura es el requisito inicial.

Las ACs no solo representan la respuesta biológica a la exposición ocupacional/ambiental, sino que también a los efectos combinados de la exposición, a la constitución genética del individuo, a las diferencias en las enzimas del metabolismo o de la capacidad de reparación del ADN (Bogen, 1993.; Sorsa *et al*, 1996.; Lengauer *et al*, 1998), a las condiciones nutricionales, como por ejemplo la deficiencia de folato (Blount *et al*, 1997.) y a otros factores individuales, los cuales no tuvieron influencia en los resultados de nuestro estudio (a excepción de los antecedentes familiares de Cáncer).

Los antecedentes familiares de cáncer y la asociación con el biomarcador ACs pueden presentarnos información de cómo los carcinógenos genotóxicos del humo de leña pueden haber interactuado con las generaciones pasadas, debido al mismo estilo de vida y a las condiciones socioeconómicas que enfrenta actualmente nuestra población objeto de estudio. Sin embargo no se descartan factores como: el ambiente en general, exposición clínica por radiaciones ionizantes, y la generación interna de especies genotóxicas, influenciados por fenómenos internos (susceptibilidad individual) tales como metabolismo, errores en la replicación del ADN, inflamación y estrés oxidativo que pudieron afectar a cada grupo en particular (Norppa *et al*, 2006, Liu *et al*, 1999; Sowa y Morgan, 2004). Los antecedentes de cáncer por la exposición a combustibles de biomasa, podrían ser el resultado del desequilibrio genético causado por los agentes genotóxicos generados por el humo de leña (Lan *et al.*, 1993). Por consiguiente este estudio y otros llevados a cabo en distintas regiones geográficas de individuos expuestos ambientalmente a combustibles de biomasa (Sungu *et al*, 2001; Kato *et al*, 2004; Musthapa *et al*, 2004; Pandey *et al*, 2005; Torres-Dosal *et al*, 2008) se convierten en una pieza clave que permiten advertir el daño en el ADN con un elevado riesgo a desarrollar enfermedades como el cáncer en individuos expuestos crónicamente a agentes genotóxicos a través de los estudios epidemiológicos y de monitoreo genético. Kleinerman *et al*, (2002) constató que la contaminación del aire a través de la combustión de la leña, está asociada con el desarrollo de cáncer de pulmón y del tracto aero-digestivo superior. En Japón y China Sobue, (1990), Liu *et al*, (1993), Dai *et al*, (1996) y Ko *et al*, (1997)

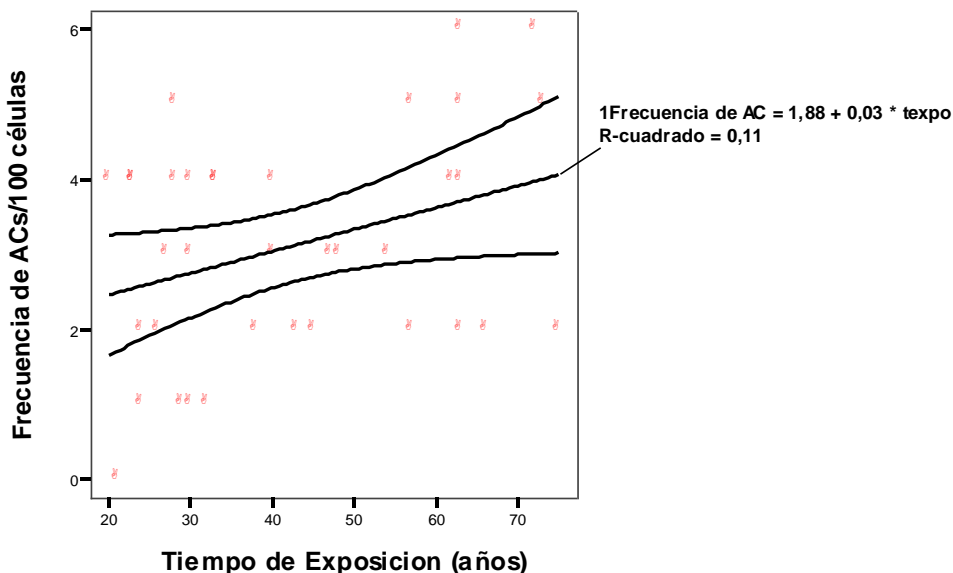
reportaron una asociación entre el uso de combustibles de biomasa y el cáncer de pulmón en mujeres expuestas. Un estudio caso-control en Europa reportó un incremento de riesgo de cáncer de pulmón entre un 20-30% en aquellas mujeres que cocinaban con madera respecto a las que nunca usaron biomasa para cocinar (Lissowska *et al*, 2005).

El consumo de vegetales no mostró una diferencia significativa entre las mujeres expuestas y no expuestas cuando se asoció con los biomarcadores ACs e IM ($p= 0,627$ y $p= 0,834$) (Tabla 5), de la misma manera Raimondi *et al*, (2007) no encontró ninguna asociación significativa entre la dieta y biomarcadores de daño en el ADN, daño oxidativo en el ADN y ACs, cuando se evaluaron 356 individuos expuestos y no expuestos ocupacionalmente a HAPs. Mustapha *et al*, (2004) informó que el consumo ocasional de vegetales no presentó un efecto significativo en la frecuencia de MN o ACs en mujeres expuestas a distintos combustibles. Sin embargo puede convertirse en una importante variable de discusión por la existencia de estudios contradictorios (Sram *et al*, 2007), debido a que se conoce que muchos vegetales con propiedad antioxidante no sólo son un recurso de fitonutrientes sino que también contienen compuestos químicos con propiedades antioxidantes, antimutagénicas y comutagénicas (Cavalcante *et al*, 2003).

La prueba de Rho de Spearman fue usada para comparar el IM, frecuencia de rupturas Cromatídicas, rupturas Cromosómicas y frecuencia total de ACs con la variable edad en ambas poblaciones, al no cumplir con la distribución normal y diferencia en varianza. En la Tabla 5, se observa que al agrupar en tres categorías la edad de ambos grupos no se presentó una asociación significativamente estadística entre la edad de las mujeres expuestas y no expuestas y el incremento de las rupturas de ACs totales ($p= 0,231$). Sin embargo el IM si se vio afectado por la edad ($p=0,022$). Estudios previos de daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a la contaminación del aire urbano en Turquía, coinciden con que factores como la edad y el genero no influyen significativamente con los biomarcadores citogenéticos (Burgaz *et al*, 2001) Estudios de biomonitoreo ambiental en poblaciones expuestas a distintos agentes tóxicos (mercurio) y a radiaciones ionizantes, no encontraron diferencia significativa en ninguno de los factores de confusión analizados (edad, sexo, habito de fumar, consumo de alcohol) respecto a la frecuencia de los biomarcadores citogenéticos analizados (ACs, ICHs) (Oliveira *et al*, 2004; Miyaji y Cólus, 2002; Ceballos-Quintal *et al*, 2002). El retraso del ciclo celular podría estar relacionado con los cambios fisiológicos que se producen a medida que se avanza con la edad. D'Arce *et al* (2000) mostró que el índice mitótico de los individuos expuestos a plaguicidas en el Brasil, fue mas bajo en los controles respecto a la edad. Tal relación fue evidenciada por Latzuka *et al* (1994) al encontrar una correlación negativa entre la edad y el índice de replicación y la proliferación celular. Sin embargo, es claro que la cinética de proliferación celular está influenciada por las condiciones del cultivo y la edad del donador, así que para ser capaces de comparar resultados cuando un estudio de monitoreo se lleva a cabo, es importante controlar el mitógeno, el medio de cultivo, las condiciones de cultivo, los tiempos de cosecha, la edad y el sexo, entre los grupos controles y los expuestos (Gonsebatt *et al*, 1995; Sánchez, A., 2005).

El tiempo de exposición al humo de leña, presentó asociación significativa ($p=0,027$ prueba de Spearman) con el Índice Mitótico. Con la frecuencia de ACs no se presentó asociación significativamente estadística ($p=0.085$) (Tabla 5), sin embargo, aunque los datos no se acomodaban a la distribución normal, por el tamaño de muestra $n=36$, se decidió aplicar una prueba paramétrica justificada según el Teorema del Limite Central. El diagrama de dispersión, en la figura 5, muestra como el tiempo de exposición al humo de leña se asocia significativamente con la frecuencia de ACs (Prueba de Pearson $p= 0,045$) (Fig. 6).

Figura 6. Análisis de asociación entre la frecuencia de ACs y el tiempo de exposición al humo de leña.



Gonsebatt *et al*, (1995) observaron que los trabajadores expuestos a residuos químicos peligrosos en México, exhibieron significativamente mas alta frecuencia de deleciones cromatídicas y cromosómicas las cuales estuvieron asociadas con el tiempo de exposición. Castillo y Trejo, (2007) encontraron que la frecuencia de ACs en mujeres expuestas al humo de leña estaba asociada positivamente con el tiempo de exposición al humo de leña ($p=0.000$). Bolognesi, (2003) reportó que el tiempo de exposición ha sido correlacionado positivamente con el daño citogenético. Aparentemente los efectos parecen ser acumulativos por la continua exposición a distintos agentes químicos y mezclas de ellos. Kamla-Raj, (2006) reveló que los policías de transito expuestos ambientalmente por mas de 10 años presentaron una diferencia significativa con aquellos que trabajaron menos de 10 años ($p<0,005$), demostrando que las ACs se incrementan con el tiempo de servicio.

Chandrasekaran *et al*, (1996) también encontró que se presentaron mas altos valores de ICHs en aquellos policías de tránsito que trabajaron por mas de 5 años. Por su parte Sobti y Bhardwaj (1993); Chitra *et al*, (2001) ratificaron la alta incidencia de ACs en personas expuestas a emanaciones de petróleo y diesel con el tiempo de exposición. Umadevi *et al*, (2003) llevo a cabo un estudio en 154 trabajadores expuestos ocupacionalmente al cisco de tabaco y 138 hombres no expuestos. Los resultados mostraron una diferencia significativa en la frecuencia de ACs de aquellos individuos que estuvieron expuestos por mas de 30 años respecto al grupo control ($p < 0.001$). Ceballos-Quintal, *et al*, (2002) llevo a cabo un estudio en sujetos expuestos a radiaciones ionizantes. En los resultados encontraron un mayor número de ICHs y ACs en los sujetos expuestos respecto al grupo control. Por medio del análisis de correlación lineal, además encontraron que hubo diferencia significativa entre el porcentaje de ACs e ICHs y los años de exposición, es decir que existe incremento en los hallazgos citogenéticos cuando la antigüedad de la exposición es mayor. Es decir que una exposición constante durante muchos años estaría incrementando la frecuencia de ACs, indicando un efecto acumulativo de exposición a la cantidad excesiva de carcinógenos presentes en el humo de leña

Al asociar las características particulares de la población expuesta como: “ventilación de cocina”, “ubicación del recinto donde cocina” y “exposición diaria”, no se presentó ninguna asociación con ACs (Tabla 6). He *et al*, (2005); Jin *et al*, (2005), reportaron además que los contaminantes producidos por la combustión de la leña se dispersan por toda la casa, incluso en aquellas áreas donde no hay estufa (dormitorios); incluso la mayoría de las casas de las mujeres son de madera, con techos de lámina de asbesto y los pisos de tierra, de tal manera que es muy fácil que las sustancias emitidas puedan quedarse adheridas a este tipo de componentes porosos. Este resultado se debe probablemente a que los individuos están expuestos a altas concentraciones de partículas cuando se encuentran en otro ambiente diferente al de la cocina, debido a que mucho del humo provocado por la quema de leña en las cocinas, sale al exterior exacerbado por los largos tiempos que los fogones quedan encendidos (3-5 horas por día). Un estudio llevado a cabo en México por Tzintzun-Cervantes *et al*, (2005) mostró como las concentraciones de PM (2,5) se mantuvieron elevadas aun después de la implantación de estufas eficientes de leña y las emisiones generadas en el interior de las cocinas tuvieron una influencia sobre los niveles de PM (2,5) alcanzados en el exterior de las casas.

Cuando se evaluó la edad en las 36 mujeres individualmente (Tabla 6) y se asocio al biomarcador ACs, se observó que a pesar de que la significancia con la prueba de Spearman no fue menor a 0,05, el valor fue cercano $p=0,085$; así que teniendo en cuenta el Teorema de Limite Central se aplicó la prueba paramétrica de Pearson donde los resultados arrojaron una significancia estadística de $p=0,032$ (Fig. 7). Posteriormente se agrupó la edad en tres categorías para reconocer si a mayor edad se incrementa la frecuencia de ACs. El gráfico de barras muestra como las mujeres de la categoría 3 (mujeres entre los 54-75 años) presentaron una leve diferencia respecto a las 2 categorías restantes (mujeres < 50 años) (Fig. 8).

Tabla 6. Asociación entre las características particulares de la población expuesta al humo de leña y las Alteraciones Cromosómicas.

Factores	Alteraciones cromosómicas en mujeres expuestas
	Media \pm Error Estándar (n)
Ventilación lugar donde cocina	3,11 \pm 0,274 (27)
Si	3,11 \pm 0,588 (9)
No	1,000 ^c
<i>p</i>	
Ubicación recinto donde cocina	
Fuera de la casa	3,07 \pm 0,262 (28)
Dentro de la casa	3,25 \pm 0,675 (8)
<i>p</i>	0,723 ^c
Exposición Diaria al humo de leña	
Medio día	2,77 \pm 0,395 (13)
Todo el día	3,30 \pm 0,317 (23)
<i>p</i>	0,312 ^c
Edad (años)	
20-29	24,82 \pm 0,903 (11)
30-50	39,15 \pm 1,96 (13)
54-75	64,00 \pm 1,899 (12)
<i>p</i>	0,085 ^e
	0,032 ^f

p: significancia estadística

^c Prueba de Mann-Whitney

^e Prueba de Spearman

^f Prueba de Pearson

Estudios previos han demostrado un fuerte efecto de asociación de la edad con los biomarcadores citogenéticos, y el daño incrementado en función de la edad de individuos expuestos (Bolognesi *et al*, 1997c; Bonassi *et al*, 2001). Por su parte Mustapha *et al*, (2004) encontró que el grupo de mujeres con edades mayores a 30 años y con más de 10 años de exposición, mostraron significativamente una frecuencia más alta de ACs y MN que las mujeres similarmente expuestas pero menores a 30 años ($p < 0,01$). De la misma manera Bonassi *et al*, (2001) encontró que la frecuencia de MN se incrementa con la edad y observo un aumento brusco en personas mayores a 40 años de edad. Un estudio llevado a cabo en Colombia en mujeres expuestas al humo de leña reportó que el grupo de mujeres $n=29$ (58%) categorizadas con alta frecuencia de ACs y con edades y tiempo de exposición mayores a 30 años mostraron significativamente ($p=0.000$) una mayor frecuencia de ACs en comparación con el grupo de mujeres $n=21$ (42%) que exhibieron una baja frecuencia de ACs cuya edad y tiempo de exposición al humo de leña no supera los 30 años (Castillo y Trejo, 2007). El aumento en la inestabilidad cromosómica espontánea con la edad esta relacionado con una acumulación de daño en el ADN debido a una progresiva deficiencia en la capacidad de reparación total del ADN y el aumento de radicales libres muy reactivos en las células. (Bolognesi *et al*, 1999).

Figuras 7. Asociación entre la frecuencia de ACs y la edad de mujeres expuestas al humo de leña.

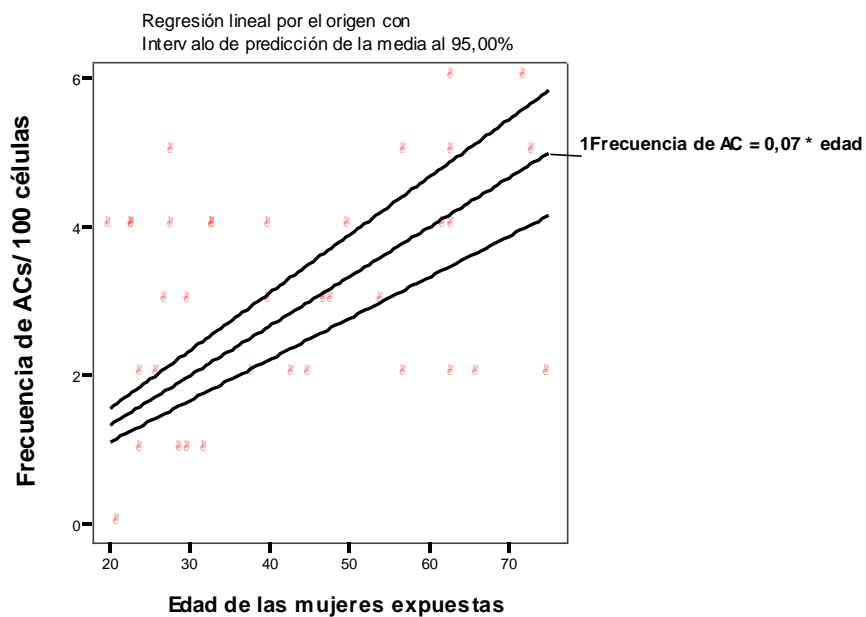
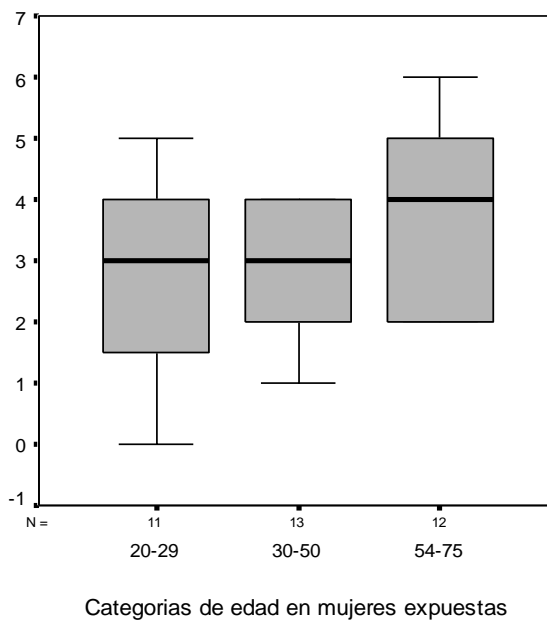


Figura 8. Categorización de la edad de mujeres expuestas al humo de leña con relación a la frecuencia de ACs.



9. IMPACTO

Se estableció en Colombia y específicamente en el Municipio de Popayán -Cauca, la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas e Índice Mitótico en linfocitos de sangre periférica, como medios para determinar el daño genotóxico y citotóxico implicado por la exposición al humo de leña debido a los componentes carcinogénicos presentes en el mismo después de la combustión incompleta.

Desde el punto de vista social-científico, la identificación de agentes mutagenéticos/carcinogénicos tiene un impacto importantísimo en la prevención de enfermedades como el cáncer, estableciendo así el posible riesgo por la exposición ambiental en la población que se encuentra expuesta al humo de leña y que pertenece a las zonas rurales del Municipio de Popayán.

Se implementaron estrategias preventivas a través de la motivación y promoción de charlas, con el objetivo de contrarrestar la exposición crónica al humo de leña, igualmente se fortaleció la formación científica en estudiantes de grado.

Con esta investigación se contribuyó al campo de la salud ambiental, dejando un soporte para futuras investigaciones en el programa de biología y ciencias a fines.

Los resultados también sirvieron como referencia para la comunidad científica al contar con datos confiables y verificables de aspectos genéticos que contribuyen con las investigaciones que se están desarrollando en diferentes partes del mundo en poblaciones expuestas al humo de leña.

10. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que las mujeres que usan la leña como combustible para cocinar tienen una más alta frecuencia de Alteraciones Cromosómicas en sus linfocitos y una reducida frecuencia del Índice Mitótico, como efecto del daño genotóxico y citotóxico ocasionado por los mutágenos químicos presentes en el humo de leña, respecto al grupo de mujeres no expuestas.

Las ACs en este estudio fueron en su mayor proporción tipo cromatídico. Teniendo en cuenta el momento del ciclo celular en que se produce el daño genético, las alteraciones de tipo cromatídico se produjeron in vitro en cromosomas ya replicados, donde los componentes del humo de leña actuaron básicamente en el periodo S/G2 del ciclo celular.

Dentro de las variables identificadas que pueden estar modulando el efecto genotóxico del humo de leña, el tiempo de exposición afectó significativamente la frecuencia de ACs e Índice Mitótico.

De acuerdo con los resultados, la población expuesta crónicamente al humo de leña ambiental, se encuentra en un potencial riesgo respecto a la población referente, ya que los altos niveles de ACs son un biomarcador predictivo de enfermedad por exposiciones ocupacionales/ambientales a agentes genotóxicos. Sin embargo no es factible encontrar únicamente daños a nivel genético que se manifiestan por medio de la inducción de ACs, sino también otro tipo de alteraciones biológicas, como los efectos sobre el índice mitótico que indicaron citotoxicidad producto de la exposición crónica al humo de leña.

La edad en el grupo de las mujeres expuestas influyó significativamente incrementando la frecuencia de ACs, sugiriendo que las condiciones fisiológicas propias de la edad avanzada afectaron la capacidad de reparación de los daños producidos por la exposición al humo de leña.

Como los resultados de la investigación están positivamente asociados con el factor de riesgo, contribuyen a la literatura científica regional, nacional e internacional ya que evidencian el indispensable uso de los biomarcadores citogenéticos como detectores tempranos de efectos potencialmente adversos en la salud de mujeres expuestas, pertenecientes a zonas rurales aledañas al Municipio de Popayán, Cauca.

El estudio de monitoreo genético arrojó diferencias entre el grupo de mujeres expuestas respecto el grupo referente. Resultados que serán tenidos en cuenta para promover una mayor conciencia, prevención y educación en las personas interesadas y en las familias directamente involucradas con el factor de riesgo; así como, el diseño de mejores estrategias para minimizar la elevada exposición a combustibles de biomasa.

11. RECOMENDACIONES

Se sugiere la realización de estudios moleculares con el fin de establecer cómo los polimorfismos genéticos afectan el nivel de los biomarcadores de efecto. Por su parte, el impacto de los polimorfismos genéticos como biomarcadores de susceptibilidad son claves para el entendimiento de los procesos de daño genético involucrados en la mutagénesis y carcinogenesis.

Por los resultados obtenidos en nuestro proyecto, se recomienda proseguir con la evaluación de Alteraciones Cromosómicas en mujeres expuestas de otras zonas rurales del municipio de Popayán, a fin de obtener un mayor conocimiento que permita aportar valor científico tanto a los programas de monitoreo citogenético como a los programas de vigilancia epidemiológica llevados a cabo mundialmente.

A futuro, se propone llevar a cabo un estudio prospectivo para determinar cuantas mujeres expuestas y no expuestas desarrollaron algún tipo de enfermedad sea por exposición a factores ambientales/ ocupacionales o por susceptibilidad individual. Por tanto se pretende incrementar el tamaño de muestra para hacer más significativas las observaciones con el factor de riesgo.

Se invita a la elaboración de proyectos donde se evalúen las concentraciones de los principales compuestos citotóxicos y genotóxicos producidos por la combustión de biomasa y el uso de biomarcadores de exposición que permitan medir los niveles de los distintos compuestos acumulados en cada individuo, con el fin de reducir la exposición a través de la promoción de cocinas eficientes, apoyadas por entidades gubernamentales y ambientales interesadas en la salud de personas en alto riesgo y en condiciones socioeconómicas desfavorables.

ANEXOS

A. ENCUESTA CORTA

Las estudiantes de la Universidad del Cauca de 9 semestre de biología y que se encuentran realizando su trabajo de grado, requieren de su voluntaria colaboración para conformar un grupo para el estudio “ **Frecuencia de Alteraciones Cromosomicas Asociadas Con La Exposición Crónica al Humo de Leña como un Factor de Riesgo en la Salud De Mujeres Pertenecientes a Zonas Rurales Aledañas al Municipio De Popayán, Cauca**”. Por favor llenar esta corta encuesta y en caso de que usted sea seleccionado lo contactaremos.

La información que usted suministrará en esta encuesta es
ABSOLUTAMENTE CONFIDENCIAL

Nombre: _____
Ocupación: _____
Edad: _____ años Sexo: F: _____ M: _____
Vereda: _____ Dirección (casa): _____ Teléfono: _____
Cocina con Leña: Si: _____ No: _____ Cuantos años ha estado expuesto: _____
El lugar donde cocina es ventilado: Si _____ No: _____
Tipo de recinto: dentro de la casa: _____ fuera de casa: _____
Horas al día expuesto al Humo de Leña: todo el día: _____ al medio día _____
Material que usa como combustible: _____
Fuma cigarrillo: Si: _____ No: _____
Ex -Fumador: Si: _____ No: _____ hace cuantos años: _____
Ha tenido enfermedades como hepatitis: Si: _____ No: _____
Consume drogas psicoactivas: Si: _____ No: _____
Ha sido Irradiado: Si: _____ No: _____ Cuando: _____
Consume bebidas alcohólicas: Si: _____ No: _____
Hace cuanto tiempo: _____
Ha estado expuesto a plaguicidas Si: _____ No: _____ cuantos años _____
Problemas de salud: _____
Tiene problemas respiratorios: Si: _____ No: _____

AGRADECEMOS SU VALIOSA COLABORACIÓN

B. ENCUESTA LARGA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA

Código

--	--	--

Fecha: _____
 Nombre: _____ Edad: _____
 Vereda: _____ Dirección: _____ Teléfono: _____
 Etnicidad: _____
 Expuesto a humo de leña: SI _____ NO _____
 Tiempo de exposición (años): _____
 Horas al día expuesto: medio día _____ todo el día _____
 Lugar de cocina ventilado: SI _____ NO _____
 Tipo de recinto: Dentro de casa: _____ fuera de Casa: _____
 Material que usa como combustible: _____
 Nivel de educación: Primaria _____ Secundaria _____ Universitaria _____
 Consume bebidas alcohólicas _____ con qué frecuencia _____
 Consume cigarrillo: si _____ No _____ Frecuencia _____
 Ex fumador: _____ Meses/años sin fumar _____
 Consume Drogas psicoactivas: Si _____ No _____ Frecuencia: _____
 En su familia han ocurrido casos de malformaciones SI _____ NO _____
 Ha sido irradiado: Si _____ No _____ Hace cuanto _____
 Ha sufrido de hepatitis Si _____ No _____ Hace cuanto _____
 Se ha realizado algún examen a nivel respiratorio: Si: _____ No: _____
 Hace cuanto: _____
 Antecedentes familiares con cáncer _____

En algún momento, usted ha presentado algunas de estas alteraciones:

ALTERACIONES RESPIRATORIAS:

ALTERACIONES	SI	NO
Irritación nasal		
Ardor de garganta		
Tos seca		
Obstrucción nasal		
Sequedad de la boca		
Dolor o dificultad para respirar (Disnea)		
Hemorragia nasal (Epistaxis)		
Asma		

ALTERACIONES OCULARES:

ALTERACIONES	SI	NO
Lagrimeo		
Irritación ocular		
Conjuntivitis		

ALTERACIONES NEUROLÓGICAS:

ALTERACIONES	SI	NO
Dolor de cabeza		
Fatiga		
Somnolencia		
Mareo		
Disminución de la memoria		

Ha estado expuesto a otro tipo de químico SI _____ NO _____ Hace cuanto tiempo _____

C. CONSENTIMIENTO INFORMADO

MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS EXPUESTAS AL HUMO DE LEÑA

YO _____, mayor de edad, declaro que, he sido informado por las estudiantes del grupo de TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA de la Universidad del Cauca, que realizarán el estudio “Frecuencia de Alteraciones Cromosómicas Asociadas Con La Exposición Crónica al Humo de Leña como un Factor de Riesgo en la Salud De Mujeres Pertenecientes a Zonas Rurales Aledañas al Municipio De Popayán, Cauca). Se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Identificar el efecto citotóxico y genotóxico asociado a la exposición crónica del humo de leña, empleando los biomarcadores: índice mitótico (IM), y alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica. Los resultados de este estudio serán de gran utilidad para poder desarrollar estrategias de prevención en los problemas de salud de todas aquellas personas expuestas al humo de leña.

YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO. En este estudio serán seleccionadas 30 mujeres expuestas al humo de leña y 30 no expuestas, El propósito de esta investigación tiene relevancia Social y Científica y obedece a una problemática de salud pública.

Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados y explicados de manera personal y confidencial al grupo objeto de estudio en forma anónima por parte de los estudiantes. Los datos no serán utilizados con otra finalidad distinta al de esta investigación.

REQUERIMIENTOS. Yo en pleno uso de mis facultades mentales, libre y consciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que éste requiere de mí, lo siguiente: contestar un cuestionario de aproximadamente 10 minutos, para suministrar información personal, referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar. Si soy seleccionado para el estudio debo donar 5mL de sangre periférica a las personas encargadas de la investigación. La sangre se tomara del brazo por personal capacitado, para ser procesada en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, mediante las pruebas de índice mitótico y alteraciones cromosómicas

RIESGO DE PARTICIPACIÓN: Los riesgos de participación en el estudio son: el sangrado e infección en el sitio de la toma de la muestra, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de la muestra de sangre del brazo, y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y jeringas estériles nuevas.

Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se dará a conocer en forma grupal, más no individual en un seminario.

BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE: socialización voluntaria en los respectivos centros comunales con el fin de motivar hacia el cambio de actitud para prevenir el riesgo en la salud por la exposición crónica al humo de leña.

YO ENTIENDO QUE

Mi participación es completamente voluntaria y puedo rehusarme a responder cualquier pregunta, si así lo deseo o puedo tomar la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo, en cualquier momento sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo. La información recolectada no será usada para discriminación de tipo social, laboral, cultural, religiosa, política, en salud, ni de ninguna índole.

La información recolectada, será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de los otros participantes, para obtener resultados grupales.

La Universidad del Cauca se compromete a vigilar que las muestras de sangre serán reunidas por un profesional experto y autorizado, en forma aséptica para evitar complicaciones.

Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga, durante o después del estudio, a la directora del proyecto, Dra. Noelia Cajas y a los estudiantes de la Universidad del Cauca, responsables del estudio, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética, en la carrera 2° No 1 A 25, Barrio Caldas, Popayán. En el teléfono: 8209800 Ext. 2614.

Los procedimientos alternativos principales, incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje claro que yo he podido entender.

Los riesgos y molestias que puedan presentarse, me han sido explicados claramente.

Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas, en forma grupal, sin que se de a conocer nombres.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste el estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente, acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico “Frecuencia de Alteraciones Cromosómicas Asociadas Con La Exposición Crónica al Humo de Leña como un Factor de Riesgo en la Salud De Mujeres Pertenecientes a Zonas Rurales Aledañas al Municipio De Popayán, Cauca)”

Nombre del participante

Firma del Participante

Nombre del testigo

Firma del testigo

Firmado en la Ciudad de Popayán a los _____ días del mes de _____ de 2008

D.

BIBLIOGRAFIA

- ALBALAK, R., FRISANCHO, A.R., y KEELER, G.J. Domestic biomass fuel combustion and chronic bronchitis in two rural Bolivian villages. *Thorax*. 1999. 54(11), 1004-1008.
- ALBALAK, R. Cultural practices and exposure to particulate pollution from indoor biomass cooking: effects on respiratory health and nutritional status among the Aymara Indians of the Bolivian highlands. University of Michigan. 1997.
- ALBERTINI, R.J., *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 2000. 463.. 111-172.
- ALFHEIM, I., y T. RAMDAHL. Contribution of wood combustion to indoor air pollution as measured by mutagenicity in *Salmonella* and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration. *Environ Mutagen*, 1984. 6(2): p. 121-30.
- AM, J. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Crit Care Med*. 1995.152:S77–S121.
- AMES, B., GOLD, L., WILLET, V., The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 1995. 92:5258–65.
- ANDRAE, S., AXELSON, O., BJORKSTEN, B., FREDRIKSSON, M., y KJELLMAN, N.I. Symptoms of bronchial hyperreactivity and asthma in relation to environmental factors. *Archives of Disease in Childhood*. 1988. 63: 473-478.
- ARBOLEDA-MORENO, Y., *et al.* Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en jóvenes fumadores en Colombia. *Rev Panam Salud Pública*. 2004; 15(6):367–72.
- ASITA, A.O., *et al.* Mutagenicity of woodsmoke condensates in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res*. 1991. 264(1): p. 7-14.
- AUROMA O.I., *et al.* Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidasa. *J. Biol Chem*. 1989; 264:13024-8.
- AU, W.W. Life style factors and acquired susceptibility to environmental disease. *Int J Hyg Environ Health*. 2001. 204:17-22.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res*. 2000. 464:65-76.
- BALAKRISHNAN K, *et al.* Daily average exposures to respirable particulate matter from combustion of biomass fuels in rural households of southern India. *Environ Health Perspect*. 2002.110:1069– 1075.

BARBISAN, *et al.* Vidal, Apoptosis and catastrophic cell death in benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells, *Mutat. Res.* 431 (1999) 133–139.

BATISTA, G., *et al.* Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. *Rev. Biomed*, 2006; 17:(en prensa).

BELL, J. Paraffin epithelioma of the scrotum. *Edinburgh Med J.* 1876. 22:135-137.

BINKOVA, B., *et al.* Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000–2001, *Mutat. Res.* 2003. 525:43–59.

BLOUNT, B., MACK, M., *et al.* Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implication for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. 94: 3290–3295.

BOGEN, K. T. Reassessment of human peripheral t-lymphocyte lifespan deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. 64: 195–204.

BOLOGNESI C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* (2003). 543:251–272.

BOLOGNESI C., *et al.* Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. (1999). *Age Ageing* 28:393–397.

BONASSI, S., *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007. vol.28 no.3 pp.625–631.

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

BONASSI, S., *et al.* Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005. 45:258-270.

BONASSI, S., ZNAOR, A., NORPPA, H., y HAGMAR, L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res.* 2004. 104: 376-382.

BONASSI, S., *et al.* Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesisblock micronucleus assay in human lymphocyte: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 2001. 37:31–45.

BONASSI, S., *et al.* Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Research.* 2000. 60[6], 1619-1625.

BONASSI, S. Combining environmental exposure and genetic effect measurements in health outcome assessment. *Mutat Res.* 1999. 428: 177-185.

BONASSI, S., *et al.* Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer epidemiol biomarkers prev.*1995. 4:671-679.

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

BRAUER, M y KENNEDY, S.M. Gas stoves and respiratory health. *Lancet.* 1996. 347: 426-431.

BRUCE, N., PEREZ-PADILLA,R., y ALBALAK, R. The health effects of indoor air pollution exposure in developing countries. World Health Organization. 2002.

BRUCE, N., PÉREZ PADILLA R., y ALBALAK, R. Contaminación del aire de locales cerrados en los países en desarrollo: un importante reto ambiental y de salud pública. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud.* 2001. recopilación de artículos 4:38-52.

BRUCE, N., PEREZ-PADILLA, R., y ALBALAK,R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bulletin of the World Health Organization.* 2000. 78: 1078-1092.

BUTLIN, H.T. Three lectures on cancer of the scrotum in chimneysweeps and others. *Brit Med J.* 1892. 2:66-71.

CALDERÓN, S., GÓMEZ, A., *et al.* The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutation Research.* 2004. 558: 7–17.

CALLE, E.E., y ZEIGHAMI, E.A. Health Risk Assessment of Residential Wood Combustion. *Indoor Air Quality.* 1984. 39-53.

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

CARERE A, *et al.* Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants. *Mutat Res,* 1995. 332: 17-26.

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

CASADO J. *et al.* Oxidantes y radicales en biomedicina. *Rev med univ Navarra.* 1996; 40 (2): 231-40.

CASTILLO, W.O., y TREJO, L. Evaluación *in vitro* del extracto etanólico de *spinacia oleracea*, mediante el biomarcador de aberraciones cromosómicas en mujeres expuestas al humo de leña. Trabajo de grado (biólogo). Universidad del cauca. Facultad de ciencias naturales exactas y de la educación. Departamento de biología. Popayan. 2007.

CEBALLOS-QUINTAL, *et al.* Incremento de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas en personas sanas con exposición laboral a rayos X. *Rev Biomed* 2002; 13:76-82.

CEYLANA, E., *et al.* Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respiratory Medicine*. 2006. 100: 1270–1276.

CHANDRASEKARAN, R, *et al.* Increased sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from traffic policemen exposed to automobile exhaust pollution. *Hum Exp Toxicol*, 1996.15: 301-304.

CHEN, B.H., HONG, C.J., PANDEY, M.R., y SMITH, K.R. Indoor air pollution in developing countries. *World Health Stat Q*. 1990. 43:127-138.

CHEESEMAN KH, SLATER TF. An Introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. 1993; 49 (3): 481-93.

CHIANG, T.A., *et al.* Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Food Chem Toxicol*. 1999; 37:125-34.

CHIANG, T.A., WU, P.F., KO., Y.C. Identification of carcinogens in cooking oil fumes. *Environ Res* 1999; 81:18-22.

CHITRA CK, *et al.* Cytogenetic monitoring of men occupationally exposed to airborne pollutants. *Environ Pollut*, 2001. 112: 391-393.

COGHLAN J.C., *et al.* Reperfusion of infarcted tissue and free radicals. *Lancet*. 1991; 338 (8775):1145-6.

COLLINS, A.R. Molecular epidemiology in cancer research. *Mol Aspects Med*. 1998. 19: 359-432.

COLLINGS, D.A., *et al.* Indoor woodsmoke pollution causing lower respiratory disease in children. *Trop Doct*. 1990 Oct. 20:151-5.

CORREIA, J., Y LOBERT. S. Physiochemical Aspects of Tubulin-Interacting Antimitotic Drugs. *Curr Pharm Des*. 2001. 7: 1213-1228.

COSTA, C. *et al.* Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticidas. *Mutagénesis*. 2006. vol. 21 no. 5 pp. 343–350.

CRAIGHILL, J. Health effects of wood smoke. Publication & forms home washington state department of ecology home. March 1997. 92-046. p 15.

CUENCA Y RAMÍREZ. Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. *Rev. Biol. Trop*. 2004; 52 (3): 623-628.

D'ARCE, *et al.* Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratogenesis, carcinogenesis and Mutagenesis*. Mayo 15 de 2000. (20): 3.161–170.

DAI, X.D., *et al.* The etiology of lung cancer in nonsmoking females in Harbin. *Lung Cancer. China. Suppl.* Vol.14. 1996. 1:S85-S91.

DASCH, J.M. Particulate and gaseous emissions from wood-burning fireplaces. *Environmental Science & Technology*.1982. 16:639-645.

DE KONING HW., *et al.* Biomass fuel combustion and health. *Bulletin of the World Health Organization—Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*. 1985, 63 (1):11–26.

DELGADO, J., RAMIREZ, A., y GONZALE G. Lung Cancer Pathogenesis Associated With Wood Smoke Exposure. *Chest*:g 2005.128: 124-131.

DEMARINI, D.M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review, *Mutat. Res.* 2004. 567: 447–474.

DENNIS, R.J. Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. *Chest*.1996. 109:115-119.

DESAI, M.A., MEHTA, S., y SMITH, K.R. Indoor smoke from solid fuels: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Geneva.2004.[Tomado el: 19/04/08] Disponible en:
<http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/en/Indoorsmoke.pdf>

DORADO, M., *et al.* Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 2003; 46:229-235.

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

DUNCAN G., *et al.* Indoor air pollution from biomass fuel smoke is a major health concern in the developing World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008. 102 p. 843—851.

DUTT, *et al.* Effect of indoor air pollution on the respiratory system of women using different fuels for cooking in an urban slum of Pondicherry. *Natl Med J. India*. 1996. 9(3):113-7.

ECHALAR, F., GAUDICHET, A., CACHIER, H., y ARTAXO, P. Aerosol emissions by tropical forest and savanna biomass burning: characteristic trace elements and fluxes. *Geophysical Research Letters*.1995. 22: 3039-3042.

EKICI, A., *et al.* Obstructive airway diseases in women exposed to biomass smoke. *Environ Res.* 2005. 99:93-98.

- ERGENE, S., *et al.* Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International* 33 (2007) 877–885.
- ESTERBAUER, H., *et al.* Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoproteína. *Free Radic Res Commun.* 1989; 6: 67-75.
- EVANS, H., SCOTT D. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X rays and maleic hydrazide in *Vicia Xfaba*. *Genetics.* 1964. 49:17–38.
- EZZATI, M., y KAMMEN, D.M. The health impacts of exposure to indoor air pollution from solid fuels in developing countries: knowledge, gaps, and data needs. *Environ Health Perspect* .2002. 110(11): 1057-1068.
- EZZATI, M., y LOPEZ, A.D. Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000. *Tob Control.* 2004.13:388-395.
- FICK, R.B., *et al.* Alterations in the antibacterial properties of rabbit pulmonary macrophages exposed to woodsmoke. *Am Rev Respir Dis.* 1984. 129(1): p. 76-81.
- FINLAYSON-PITTS y PITTS, Tropospheric air pollution ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles, *Science* 276 (1997) 1045–1049.
- FUCIC *et al.* Chromosome damage and cancer risk in the workplace: The example of cytogenetic surveillance in Croatia. *Toxicology Letters* 172 (2007) 4–11
- FINE, P.M., CASS, G.R., y SIMONEIT, B.R. Chemical Characterization of Fine Particle Emissions from the Fireplace Combustion of Wood Types Grown in the Midwestern and Western United States. *Environmental Engineering Science.* 2004. 21:387-409.
- GALLOWAY, S. Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000. 35: 191–200.
- GANI, H., *et al.* The effect of biomass exposure on lipid peroxidation and antioxidant activities on Turkish female groups. *Eur Respir J.* 2000. 16 (Suppl. 31):108s.
- GARZON, A.A., *et al.* Respiratory mechanics in patients with inhalation burns. *J Trauma,* 1970. 10(1): p. 57-62.
- GONSEBATT, M., HERRERA, L., OSTROSKY-WEGMAN, P. Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. *FM. Butterworth col. Eds. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, 1995. Nueva York. pp. 81-94.
- GONSEBATT. M.E., *et al.* Genotoxic Monitoring of Workers at a Hazardous Waste Disposal Site in Mexico. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 103, Supplement 1: Fate, Transport, and Interactions of Metals (Feb., 1995), p. 111-113

GRAFF, R., REUHL, K. Cytoskeletal toxicity of heavy metals. In: Chang LW, editor. Toxicology of metals. Boca Raton, FL: CRC Press. 1996. 639–658.

GROOPMAN, J.D., KENSLER, T.W., y LINKS, J.M. Molecular epidemiology and human risk monitoring. Toxicol Lett. 1995. 82-83: 763-769.

GUILBERT, J.J. The World Health Report 2002 Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Education for Health: Change in Learning & Practice. 2003.16:23.

GÜLGÜN. S., *et al.* Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[*a*]pyrene in cultured human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype. *Genetics and Molecular Biology*. 2006. 29(1): 142-147.

HALLIWELL, B. Oxidant and human disease: some new concepts. FASEB J. 1987. 1:358–64.

HAGMAR, L., *et al.* Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res*. 2004. 64:2258-2263.

HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., *et al.* The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2001. 204: 43-47.

HAGMAR, L. *et al.* Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs. *Recent Results Cancer Res*. 1998. 154:177-184.

HAGMAR, L. *et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH), *Cancer Res*. 58 (1998) 4117–4121

HAGMAR, A., BRØGGER, I., *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosome aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group On The Health Risk Of Chromosome Damage, *Cancer Res*. 1994. 54: 2919–2922.

HARVEY, R., *et al.* Reaction with DNA and mutagenic specificity of syn-Benzo(g)chrysene 11,12-Dihydrodiol 13,14-epoxide. *Chemical Research in Toxicology* 1994; 7 (3): 420-7.

HAYAKAWA K., *et al.* Determination of 1,3-, 1,6- and 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene in urban air by high performance liquid chromatography using chemiluminescence detection, *Environ. Sci. Technol*. 29 (1995) 928–932

HE, G., *et al.* Patterns of household concentrations multiple indoor air pollutants in China. *Environmental Science and Technology*, (2005). 39, 991–998.

HERNANDEZ-GARDUNO, E., BRAUER, M., PEREZ-NERIA, J., VEDAL, S. Wood smoke exposure and lung adenocarcinoma in non-smoking Mexican women. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004. 8:377-383.

HERRICK, R.F. Higiene industrial. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, SEAS. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Madrid, OIT; España. 2001. p.38.

HOYOS, L.S. Exposición ocupacional, biomarcadores de riesgo de cáncer en los programas de vigilancia epidemiológica ocupacional para la prevención. Salud, Revista de la facultad de Salud Universidad Industrial de Santander. 2006. 38: 29-39

HYTONEN, S., *et al.* Effect of emissions from residential wood stoves on SCE induction in CHO cells. Mutat Res. 1983. 118(1-2): p. 69-75.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Biological Dosimetry: Chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Vienna. 1986. Technical reports series No 260.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Preamble Lyon France. 2006.

JACO, H., *et al.* A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells Cardiovascular revascularization medicine 7 (2006) 165-172.

JADWIGA, M., GRAZYNA M., *et al.* Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1999. 445: 139-145.

JENKINS, B., JONES, A., *et al.* Emission factors for polycyclic aromatic hydrocarbons from biomass burning, Environ. Sci. Technol. 1996. 30: 2462–2469.

JIN, Y., *et al.* Geographical, spatial, and temporal distributions of multiple indoor air pollutants in four Chinese provinces. Environmental Science and Technology, (2005). 39, 9431–9439.

JOELLEN, L . Review air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. Mutation research. 2007. 636: 95–133.

KAMLA-RAJ . Increased Chromosomal Aberrations in Peripheral Blood Lymphocytes of Traffic Policemen of Amritsar. City Int J Hum Genet, 2006. 6(2): 125-131.

KAMLA-RAJ., *et al.* studies on the genotoxicity of an organophosphorous pesticide baytex-1000.ljhg. 2002 2(1): 19-25.

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

KHALIL, A.M. Chromosome aberrations in blood lymphocytes from petroleum refinery workers. Arch Environ Contam Toxicol, 1995. 28: 236-239.

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

KLEINERMAN, R.A., *et al.* Lung cancer and indoor air pollution in rural china. *Ann Epidemiol.* 2000. 10:469.

KNUDSEN, L.E., *et al.* Chromosomal aberrations induced by urban air pollution in humans: influence of DNA repair and polymorphisms of glutathion S-transferase M1 and Nacetyltransferase 2. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 1999. Prev. 8.(4 Pt 1), 303–310.

KO, Y.C., *et al.* Chinese food cooking and lung cancer in women nonsmokers. *Am J Epidemiol.* 2000. 151:140-7.

KO Y.C., *et al.* Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan. *International Journal of Epidemiology*, 1997. 26(1):24-31.

KOCH, D., y HANSEN, J. Distant origins of Arctic black carbon: A Goddard Institute for Space Studies ModelE experiment. *J Geophys Res.* 2005.110: 4204.

KULJUKKA-RABB T.T., *et al.* The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *J Exp Anal Environ Epidemiol* 2002;12:81-101.

LAN, Q., *et al.* Household stove improvement and risk of lung cancer in Xuan Wei, China. *J Natl Cancer Inst.* 2002. 94:826-835.

LEE C.Y., *et al.* Effects of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 on the urinary levels of 1-hydroxypyrene and 2-naphthol in aircraft maintenance workers. *Toxicol Lett* 2001;123:115-24

LENGAUER, C., KINZLER, K., and VOGELSTEIN. Genetic instabilities in human cancers. *Nature (lond.)*. 1998. 396: 643–649.

LEONARD, S.S., *et al.* Woodsmoke particles generate free radicals and cause lipid peroxidation, DNA damage, NFkappaB activation and TNF-alpha release in macrophages. *Toxicology*, 2000. 150(1-3): p.147-57.

LINDAHL, T., WOOD R. Quality control by DNA repair. *Science.* 1999. 286:1897–905.

LISSOWSKA, J., *et al.* Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol.* 2005.162:326-333.

LIU T.Z., STERN A., EMERIT I. Clastogenic factors: biomarkers of oxidative stress of potential utility in the clinical chemistry laboratory, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 29 (1999) 134 139.

LIU Q, SASCO AJ, RIBOLI E, HU MX Indoor air pollution and lung cancer in Guangzhou, People's Republic of China. *American Journal of Epidemiology.* 1993. 137(2):145-154.

LATZUKA, D., *et al.* Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutation Research.*, 1994. 306 173-180.

MADRIGAL-BUJAJIDAR. E. Evaluación del efecto genotóxico (ICHs) de la casiopéina igly en cultivo de linfocitos humanos, 2º Congreso Nacional de Química Médica.

MALDONADO, D., *et al.* Recomendaciones para el diagnóstico y el manejo del paciente con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica EPOC. *En: Revista Colombiana de Neumología.* 1997. 9: S25-S2.

MANDAL A y MANDAL S. Impact of indoor air pollutants on health of women. *Proceedings of Indoor Air 2002. 9th International conference on Indoor air quality and climate.* June 3– July 5, 2002, Monterey, California, USA

MANUEL, J. The quest for fire: hazards of a daily struggle. *Environ Health Perspect.* 2003 111(1): A28-33.

MARTÍNEZ, W., y FOLLE, G. Sección Genética Evolutiva – Facultad de Ciencias. [Tomado el: 22/04/08] Disponible en: <<http://www.genetica.fcien.edu.uy/materiales/PRACTICOS/alteraciones%20cromosomicas/alteraciones%20cromosomicas.pdf>>.

MARY, J., *et al.* Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp Gerontol.* 2004. 39:1117–23.

MATEUCA, R., *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006. 88:1515-1531.

MATTHEW, E. Murine model of smoke inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001. 280(4): p. L716-23.

McCRILLIS, R., WATTS, R., WARREN, S., Effects of operating variables on PAH emissions and mutagenicity of emissions from woodstoves, *JAWMA* 1992. 42: 691–694.

METAYER, C., *et al.* Cooking oil fumes and risk of lung cancer in women in rural Gansu, China. *Lung Cancer.* 2002. 35:111-117.

MICHALSKA, J. *et al.* Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. *Mutation Research* 445_1999.139–145

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. REPÚBLICA DE COLOMBIA. Uso racional de la energía: responsabilidad de hoy para un futuro sostenible. Julio de 2007. Disponible en: <http://www.upme.gov.co/Upme12/2007/Upme13/Presentacion_MINAMBIENTE.pdf>.

MING-TSANG, WU., *et al.* Environmental exposure to cooking oil fumes and cervical intraepithelial neoplasm. *Environmental Research.* Taiwan. January 2004, Volume 94, Issue 1, Pages 25-32.

MITELMAN, F., MERTENS, F., AND JOHANSSON, B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.*, 15: 417–474, 1997.

MISHRA, V. Effect of Indoor Air Pollution from Biomass Combustion on Prevalence of Asthma in the Elderly. *Environmental Health Perspectives*. January 2003: Volume 111: number 1.

MISHRA, V. Gender aspects of indoor air pollution and health: an analysis of gender differentials in the effect of cooking smoke on acute respiratory infections in children. World Health Organization. May 15, 2001.

MIYAJI, K. Y CÓLUS, S. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian dentists occupationally exposed to low doses of X-radiation. *Pesqui Odontol Bras*. 2002.16(3):196-201.

MOELLER, M., *et al.* Mutagenic activity and PAH-analysis of airborne particles from a wood heating community in Norway. *Environ. Int.* 1985.11: 189–195.

MUMFORD, J.L., *et al.* 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*.1990. 11, 397-403.

MUMFORD, J., HE, X., *et al.* Cooke, Lung cancer and indoor air pollution in Xuan Wei, China. *Science*. 1987. 235: 217–220.

MUSTHAPA, M.S., *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Indian women cooking with biofuels: micronucleus and chromosomal aberration tests in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 2004. 43:243-249.

NAEHER, L.P., *et al.* Woodsmoke Health Effects: A Review *Inhalation Toxicology*, Volume 19, Issue 1 January 2007. 67-106.

NAEHER, L.P., *et al.* Critical review of the health effects of woodsmoke. Air Health Effects Division, Health Canada, Ottawa. 2005.

NAUMOVA. Y.Y., *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in the indoor and outdoor air of three cities in the U.S. *Environ Sci Technol* 2002;36:2552–9

NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE, A nordic data base on somatic chromosome damage in humans, *Mutat. Res*. 1990. 241: 325–337.

NORPPA, H., *et al.* Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation research fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*.2006. 600:37-45.

NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers. *IARC Sci Publ*. 2004. 179-205.

NORPPA, H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ. Health Perspect*. 1997.105, 829–835.

OHURA T, NODA T, AMAGAI T, FUSAYA M. Prediction of personal exposure to PM2.5 and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons by their concentration in residential microenvironments. *Environ Sci Technol* 2005;39:5592–9.

OLIVEIRA, B., *et al.* Environmental Biomonitoring Using Cytogenetic Endpoints in a Population Exposed to Mercury in the Brazilian Amazon., *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2004. 44:346–349.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). En sus directrices recientemente revisadas sobre calidad del aire para proteger la salud. 2005.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. La higiene ocupacional en América latina: Una guía para su desarrollo. Van der Haar, R y Goelzer, B. Washington D.C. 2001. p.48.

OROS, D.R., y SIMONEIT, B.R. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 2. Deciduous trees. *Applied Geochemistry*. 2001. 16: 1545-1565.

ORRENIUS, S., *et al.* Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends. Pharmacol Sci*. 1989; 10:281-5.

OSPINA G., et al. In vitro antimitotic effect of methanolic extracts of seaweeds species from the Colombian Caribbean coast. 2007. vol, 14, no.2 p.84-89.[Tomado el: 19/04/08]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s012140042007000200011&lng=en&nrm=iso issn 0121-4004>.

OYARZUN, M. Factores ambientales relacionados con la gravedad del asma. *Rev Chil Enf Respir*. 2004; 20:25-29.

PALMA, S., *et al.* Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutation Research*. 2007.633 1–12.

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

PANDEY, M.R., *et al.* Domestic smoke pollution and acute respiratory infections in a rural community of the hill region of Nepal. *Environment International*, 1989; 15:337-340.

PANDEY, M.R., BOLEIJ, J.S., SMITH, K.R., y WAFULA, E.M. Indoor air pollution in developing countries and acute respiratory infection in children. *Lancet*.1989. 1:427-429.

PARSHAD, R. and SANFORD, B. Radiation-induced chromatid breaks and deficient dna repair in Cancer predisposition. *Critical reviews in Oncology: Hematology*. 2001. 37: 87–96.

PERERA, F.P., y WEINSTEIN, I.B.Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*. 2000. 21: 517-524.

PEREZ PADILLA, J.R., *et al.* The domestic inhalation of the smoke from fire wood and of other biological materials. A risk for the development of respiratory diseases. *Gac Med Mex.* Jan-Feb 1999. 135 (1):19-29.

PERFIL DEL SECTOR EDUCATIVO DEPARTAMENTO DEL CAUCA. Municipio Certificado de Popayán. República de Colombia Ministerio de Educación Nacional. Abril, 2004. [Tomado el: 19/04/08] Disponible en: <http://www.mineducacion.gov.co/1621/articles-85776_archivo_pdf6.pdf>.

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

POPE 3RD, C.A., *et al.* Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation.* 2004.109: 71–77.

POTT, P. *Cancer scroti.* Chirurgical Observations London: Hawes, Clarke and Collins. 1775. 63-78.

RAIMONDI S., *et al.* Effects of diet on biomarkers of exposure and effects, and on oxidative damage. *Mutation Research* 620. 2007.93–102.

RAIYANI C.V., *et al.* Assessment of indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons for urban poor using various types of cooking fuels. *Bull. Environ Contam Toxicol.* 1993. 50:757– 63.

REHFUESS, E., MEHTA, S., y PRUSS-USTUN, A. Assessing household solid fuel use: multiple implications for the Millennium Development Goals. *Environ Health Perspect.* 2006. 114:373-378.

RIOJAS-RODRIGUEZ, H., ROMANO-RIQUER, P., SANTOS-BURGOA, C., y SMITH, K.R. Household firewood use and the health of children and women of Indian communities in Chiapas, Mexico. *Int J Occup Environ Health.* 2001. 7: 44-53.

RODRÍGUEZ , P., *et al.* Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 2001;30:36-44.

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

ROLDÁN, E Y BELTRÁN, D. Efecto genotóxico de la crocidolita en cultivo de linfocitos humanos. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. México. 2002. V27, N° 1marzo,

ROSSNER, P., *et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect.* 2005. 113:517-520.

ROSETO, Y. Frecuencia de alteraciones cromosómicas en pacientes con cáncer de pulmón y un grupo control. Trabajo de grado (biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de ciencias naturales exactas y de la educación. Departamento de biología. Popayán. 2003.

RUSSELL, P.J. Chromosomal mutations, in: B. Cummings (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc, San Francisco, 2002, p. 595–621.

SÁNCHEZ, A. Análisis de la proliferación celular y frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos en cultivo expuestos a efluentes industriales. Tesis para obtener el grado académico de maestría en ciencias ambientales Universidad autónoma de Tlaxcala. 2005. En: <http://www.uatx.mx/investigacion/cigya/tesis/JSA.swf>

SÁNCHEZ, R., *et al.* Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*, 2004; 29:81-90.

SCHAUER, J.J., y CASS, G.R. Source apportionment of wintertime gas-phase and particle-phase air pollutants using organic compounds as tracers. *Environmental Science & Technology*. 2000. 34: 1821-1832.

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

SHERSON, D., *et al.* Biological monitoring of foundry workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *British journal of industrial medicine*. 1990; 47: 448–453.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975;31:9-15.

SERRA-BALDRICH y TRIBÓ. Antioxidantes A propósito de: Vitaminas A, C y E en la prevención del cáncer. Escuela de Nutrición, Universidad de Granada. *Nutrición Clínica*, 1991; II: 34-44.

SIERRA-TORRES CH., *et al.* Exposure to wood smoke, HPV infection, and genetic susceptibility for cervical neoplasia among women in Colombia. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 2006. 47(7): 553-561.

SIMS, J y KJELLSTRÖM, T. Biomass fuel and indoor air pollution: Underlying issues from a social perspective, in indoor air pollution from biomass fuel - working papers from a WHO consultation. World Health Organization. Geneva. 1992. 149-161. [Tomado el: 19/04/08] Disponible en: <<http://ecoharmony.com/thesis/PhDch1.htm>>.

SMERHOVSKY, Z., *et al.* Increased risk of cancer in radon-exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations. *Mutat Res*. 2002. 514:165-176.

SMITH, K.R. El uso doméstico de leña en los países en desarrollo y sus repercusiones en la salud. *Unasylva* 224. Vol. 57. 2006.

SMITH, K.R. Indoor air pollution in developing countries: recommendations for research. *Indoor Air*. 2002.12:198-207.

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

SMITH, K.R. Fuel Combustion, Air Pollution Exposure, and Health: The Situation in Developing Countries. Annual Review of Energy and the Environment. 1993. 18: 529-566.

SMITH, K.R. Biofuels, Air Pollution, And Health. A Global Review. Eds. Lester R. K. y Adelin J. plenum press. new cork. 1987.

SMITH, K.R., AGGARWAL, A.L., y DAVE, R.M. Air pollution and rural biomass fuels in developing countries: a pilot village study in India and implications for research and policy. Atmospheric Environment. 1983.17:2343-2362.

SOBUE T Association of indoor air pollution and lifestyle with lung cancer in Osaka, Japan. International Journal of Epidemiology, (19)1990. Suppl 1:S62-S66.

SOBTI, R.C., BHARDWA, D.K. Cytogenetic damage and exposure.II. Exposure to petroleum exhaust. *Mutagenesis*, 1993. 8: 101-103.

SOLANS, X., y HERNÁNDEZ, R. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo; ministerio de trabajo y asuntos sociales España; NTP Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas. 2007. [Tomado el: 19/04/08]. Disponible en: <http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_354.htm>.

SORSA, M., OSTERMAN-GOLKAR, S., et al. Assessment of exposure to butadiene in the process industry. *Toxicology*. 1996. 113: 77–83.

SOWA, M.B., y MORGAN, W.F. Radiation-induced genomic instability: a role for secreted soluble factors in communicating the radiation response to non-irradiated cells, *J. Cell Biochem*. 92. (2004) 1013–1019.

SRAM, R.J., BINKOVA, B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997–1999. *Environ. Health Perspect*. 2000. 108 (Suppl. 1), 57–70.

STADTMAN, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem*. (1993). 62: 797-821.

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

STRAIF, K., et al. Carcinogenicity of household solid fuel combustion and of high-temperature frying. *Lancet Oncol*. 2006. 7: 977-978.

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

SUNGU, S.Y., *et al.* Sister-chromatid exchange frequency in women who exposed to biomass in a village of central anatolia. Turkish Respiratory Journal.Vol.2, No.2. August 2001.

TALLEDO, D., y ESCOBAR, C. Genética de las células somáticas de raíces y tuberosas andinas. Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú. 2000.

TESTA, A., *et al.* Cytogenetic biomonitoring carried out in a village (Dolon) adjacent to the Semipalatinsk nuclear weapon test site. Radiat. Environ. Biophys. 2001.40,125–129.

TESFAIGZI Y., *et al.* Health Effects of subchronic exposure to low levels of WoodSmoke in Rats. Toxicological Sciences. 2002. 65:115-125

THORNING, D.R., *et al.* Pulmonary responses to smoke inhalation: morphologic changes in rabbits exposed to pine woodsmoke. Hum Pathol, 1982.13(4): p.355-64.

TORRES-DOSAL., *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 enviroment. 2008. 390: 362-368.

TORRES, W. H. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina. México. Cd (2002). Disponibile en: < (<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)>

TUCKER J. D *et al.* Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. Mutat Res 297:101-180 (1993).

TZINTZUN-CERVANTES, G., ZUK, M. & J. CRUZ. Evaluación de concentraciones microambientales de partículas suspendidas en hogares rurales de Michoacán y las actividades que influyen la exposición personal. INE-INSP. México. D. F. 2005. 50 pp.

UMADEVI B., *et al.* Cytogenetic effects in workers occupationally exposed to tobacco dust Mutation Research (2003). 535:147–154.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Revisions to the National Ambient Air Quality Standards for Particles Matter. Federal Register. 1997. 62: 38651–38701.

USEPA, Prescribed Burning Background Document and Technical Information Document for Prescribed Burning Best Available Control Measures, EPA-450/2-92-003, Office of Air Quality Planning and Standards, Research Triangle Park, NC. 1992. p. 317.

USEPA, TechnologyTransfer Network Clearinghouse for Inventories and Emission Factors, Compilation of Air Pollutant Emission Factors, Clearinghouse for Inventoriesand Emission Factors, AP 42, vol. 1, Stationary Point and Area Sources. Website: <http://www.epa.gov/ttn/chief/eiip/techreport/index.html>

VARGAS, A.R., y BUKA, I. Salud infantil y medio ambiente en America del Norte: Un primer informe de indicadores y mediciones disponibles. *Salud Publica de Mexico*. 2006. 48:358-359.

VENKATARAMAN, C. *et al.* Residential Biofuels in South Asia: Carbonaceous Aerosol Emissions and Climate Impacts. vol. 307. no. 5714. *Science* 4 march 2005. p. 1454 – 1456.

WATTS, R., DRAGO, R., *et al.* Wood smoke impacted air: mutagenicity and chemical analysis of ambient air in a residential area of Juneau, Alaska, *JAPCA* 1988. 38: 652–660.

WHO. Bulletin of the World Health Organization. 2000, 78 (9): 1078–1092.

WHORTON, M. The effects of the occupation on male reproductive function. In Spira, A. and Jouannet, E. (eds), *Human Fertility Factors*. Vol. 103. INSERM, Paris. 1981. 339–350.

WONG, K.L., *et al.* Evaluation of the pulmonary effects of woodsmoke in guinea pigs by repeated CO₂ challenges. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984. 75(1): 69-80.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Reducing risks, promoting healthy life*. Genova. 2002.

YANG M. *et al.* A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999;36:99-108.

YANG M. *et al.* Genetic effects on urinary 1-hydroxypyrene levels in a Korean population. *Carcinogenesis* 2003;24:1085-9.

